

Auswirkungen des LRRK2-Knockdown durch RNA-Interferenz auf die murine dopaminerge Zelllinie MN9D

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung eines doctor medicinae (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von

Lars Fransecky

aus Dresden

Dresden 2009

1. Gutachter: Alexander Storch

2. Gutachter: Richard Funk

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2009

Gottfried Wozel

Vorsitzender der Promotionskommission

Inhaltsverzeichnis

Auswirkungen des LRRK2-Knockdown durch RNA-Interferenz auf die murine dopaminerge Zelllinie MN9D	1
Inhaltsverzeichnis	1
I. Abkürzungen.....	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Parkinsonsyndrome.....	4
1.2 LRRK2	6
1.3 RNA-Interferenz.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material.....	15
2.1 Zellkultur.....	15
2.2 Instrumente.....	16
2.3 Verbrauchsmaterial.....	17
2.4 Kits und Fertiglösungen	17
2.5 Chemikalien	18
2.6 Stocklösungen und Medium.....	19
2.7 Primer.....	20
2.8 Antikörper	21
2.9 Enzyme	21
2.10 Molekulargewichtsmarker Protein	21
3 Methoden.....	22
3.1 Flussdiagramm der Experimente	22
3.2 Zellkultur.....	23
3.3 Nukleofektion.....	23
3.4 Mikroskopie transfizierter Zellen	25
3.5 Mtt-Test.....	26
3.6 BrdU Proliferations-ELISA	27
3.7 RNA-Isolierung	27
3.8 qRT-PCR.....	28
3.9 Western Blot.....	31

3.10	Statistik	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Eigenschaften der MN9D-Zellen	37
4.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz	37
4.3	Bestimmung des LRRK2-Knockdowns auf mRNA-Ebene.....	38
4.4	Bestimmung des LRRK2-Knockdowns auf Protein-Ebene.....	40
4.5	Bestimmung der Lebensfähigkeit der transfizierten Zellen.....	42
4.6	Auswirkungen des Knockdowns von LRRK2 auf Neurale Marker.....	44
4.7	Auswirkungen des LRRK2 Knockdowns auf den Zellzyklus	46
5	Diskussion	52
6	Ausblick.....	59
7	Thesen	62
8	Abbildungsverzeichnis	64
9	Tabellenverzeichnis.....	65
10	Lebenslauf	66
11	Danksagung	67
12	Erklärung zur Selbständigkeit.....	68
13	Referenzen	69

I. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
BrdU	Bromdesoxyuridin
CCND1	Zyclin D1
CDK	Zyclin abhängige Kinase
CDKN1A	Zyclin abhängiger Kinaseinhibitor 1A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
HMBS	Hydroxymethylbilansynthase
IPS	Idiopathisches Parkinsonsyndrom
LRRK2	Leucine rich repeat kinase 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
p21	Zyclin abhängiger Kinaseinhibitor 1A
PCNA	Kernantigen proliferierender Zellen
PD	Parkinson Disease
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPA3	Replikationsprotein A, Untereinheit 3
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
siRNA	small interfering RNA
TH	Tyrosinhydroxylase
Tub	beta-3-Tubulin

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der biologischen Funktion eines Proteins, das als Leucine-Rich-Repeat-Kinase 2 (LRRK2) bezeichnet wird. Seine Assoziation mit dem klinischen Auftreten von Parkinsonsyndromen macht es als Faktor in den nicht verstandenen molekularen Pathomechanismen der extrapyramidal-motorischen Erkrankungen interessant. Die folgenden Kapitel sind als Einstieg in die Thematik gedacht und beschäftigen sich mit der Gruppe der Parkinsonsyndrome, dem aktuellen Wissen über LRRK2, sowie der Methode, der im experimentellen Aufbau dieser medizinischen Doktorarbeit eine Schlüsselrolle zukommt: der RNA-Interferenz. Die Einleitung wird schließlich mit der Zielsetzung der Doktorarbeit abgeschlossen.

1.1 PARKINSONSYNDROME

Das Parkinsonsyndrom besteht aus dem Symptomenkomplex Tremor, Rigor, Bradykinese und posturaler Instabilität. Eine Vielzahl von Erkrankungen verursacht das klinische Bild eines Parkinsonsyndroms. Die mit Abstand häufigste Ursache stellt das Idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) oder Mb. Parkinson dar, welches für circa 70% der Parkinsonsyndrome verantwortlich ist [1]. Es ist gekennzeichnet durch die obligate Bradykinese mit beliebiger Kombination der anderen Charakteristika des Parkinsonsyndroms. Das morphologische Korrelat des IPS ist der Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia Nigra Pars Compacta (SNpc).

Histopathologisch werden die sogenannten Lewy-Körpern im Stammhirn als notwendige Voraussetzung für das Vorliegen des IPS angesehen. Lewy-Bodies sind intrazelluläre Aggregate aus Lipiden und Proteinen (v.a. ubiquitiniertes Synuclein- α). Das Idiopathische Parkinsonsyndrom besteht also aus 2 Komponenten: dem Parkinsonsyndrom und Lewy-Pathologie. Keines der beiden Teile allein definiert das IPS, da beide Komponenten unabhängig voneinander auftreten können.

Am Beginn der Diagnose des IPS steht die neurologische Untersuchung, bei der ein Parkinsonsyndrom vorliegen muss. Als differentialdiagnostische Hinweise auf das Vorliegen des Idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS) hat man positive Kriterien definiert, zu denen Besserung unter L-DOPA, der einseitige Beginn, die langsame Progredienz sowie L-DOPA induzierte Dyskinesien zählen. Die apparative Diagnostik

besteht neben der Substantia-Nigra-Sonographie in anderen bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie und L-DOPA- sowie Fluorodeoxyglucose-Positronen-emissionstomographie, wobei diese eher zur Differentialdiagnostik eingesetzt werden.

Das Idiopathische Parkinsonsyndrom ist mit 250.000 – 400.000 Betroffenen in Deutschland die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach Morbus Alzheimer [2]. Die Inzidenz des Morbus Parkinson nimmt wie bei den meisten multifaktoriellen Erkrankungen mit dem Alter zu, sodass die Prävalenz von 0,3 % im Alter von 50 Jahren auf 4,3 % im Alter von 85 Jahren ansteigt [3]. Das Alter ist der konsistenteste Risikofaktor für die Entwicklung des IPS. Die demographische Entwicklung wird daher einen Anstieg der Parkinson-Prävalenz in den nächsten Jahrzehnten verursachen.

Die überwiegende Mehrheit der Fälle ist sporadisch. Bei diesen ist es schwierig, ohne Hinweise auf Kausalitäten, Konzepte zur Pathogenese zu entwickeln. Aus diesem Grund erlangen die etwa 15-20 % der Erkrankten mit positiver Familienanamnese unter erstgradig Verwandten eine besondere Bedeutung [4]. Die Identifikation von monogenen Formen kann nämlich Hinweise auf die Entstehung des IPS geben, weil aus einfachen Ursache/Effekt-Beziehungen (Mutation→Krankheit) Modelle erstellt werden können. Voraussetzung ist, dass die Pathogenese der sporadischen Form gleicht oder mindestens ähnlich ist.

Bisher wurden 13 sog. PARK-Gene beschrieben, die Parkinsonsyndrome verursachen können. Genomische Multiplikationen und Missensemutationen wurden im α -Synuclein-Gen (PARK1) bei Erkrankten mit autosomal-dominanter PD gefunden [5] [6]. Autosomal-rezessive Mutationen wurden in den Genen parkin, DJ-1 und PINK1 identifiziert. Die meisten dieser Gene verursachen Parkinsonsyndrome, die nicht als idiopathisch klassifiziert werden. Zu den Charakteristika atypischer Erkrankungsformen zählt ein junges Manifestationsalter („early-onset“), fehlendes Ansprechen auf L-DOPA, Zweiseitigkeit der Symptome, frühe Demenz oder Psychose oder rasche Progredienz.

Das PARK8-Gen hingegen, welches für das Protein LRRK2 kodiert, geht mit autosomal-dominantem, sog. late-onset Parkinson, einher und kann klinisch oft nicht vom IPS unterschieden werden [7]. Es besteht daher die Hoffnung, dass die LRRK2-Pathogenese der sporadischen Form in einer Weise ähnelt, dass sie Aufschluss über den zellulären Pathomechanismus der Parkinson-Erkrankung geben kann [8] [9]. Bisher konnte kein grundlegender Mechanismus identifiziert werden, der die Krankheit auf zellulärer

Ebene erklärt. Unbestritten ist, dass die Übertragung von Dopamin vom präsynaptischen auf das postsynaptische Neuron selektiv gestört ist. Mögliche Pathomechanismen sind die Formierung zellulärer Aggregate bzw. Dysfunktion proteinärer Clearance-Mechanismen, oxidativer Stress mit mitochondrialer Dysfunktion und Apoptose oder Defekte beim Zelltransport [7].

Die Symptome manifestieren sich klinisch, wenn zwischen 60-70% der dopaminergen Neurone in der Pars Compacta der Substantia Nigra abgestorben sind [2]. Neben den Kardinalssymptomen Rigor, Tremor, Bradykinese und posturale Instabilität kommt es zu schweren vegetativen und psychischen Begleitsymptome, welche das alltägliche Leben der Patienten oft stärker als die Kardinalssymptome behindern.

1.2 LRRK2

1.2 Nomenklatur

Der Genlocus PARK8 wurde 2002 von Funayama et al. als eine Ursache für familiäres IPS in der japanischen Sagamihara-Familie identifiziert, weil dieser Locus stets mit dem Krankheitsbild weitervererbt wurde [10]. In den folgenden Jahren gelang es zwei Forschungsgruppen gleichzeitig, das Gen in dieser Region zu identifizieren [8] [9]: Das Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) – Gen befindet sich auf Chromosom 12 (12p11.2-q13.1) und erstreckt sich über 144 Kb. 51 Exons kodieren für 2527 Aminosäuren [11]. Mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von ca. 280 KDa [12] ist das Genprodukt ein sehr großes Protein. Seine Bezeichnung als Dardarin leitet sich vom Baskischen „dardara egin“ ab und bedeutet Zittern, was zum Symptomenkomplex des Parkinsonsyndroms gehört. Die Bezeichnung LRRK2 für Gen und Protein hat sich aber weitestgehend durchgesetzt und der Name PARK8 durch das HUGO Gene Nomenclature Committee für ungültig erklärt.

1.2 Struktur

Das LRRK2-Protein besteht aus 6 Domänen: der (1) Ankyrin-Repeat-Domäne, (2) Roc-Domäne, (3) COR-Domäne, (4) LRR-Domäne, (5) Tyr-Kc-Domäne und der (6) WD40 (Abbildung 1.1.).

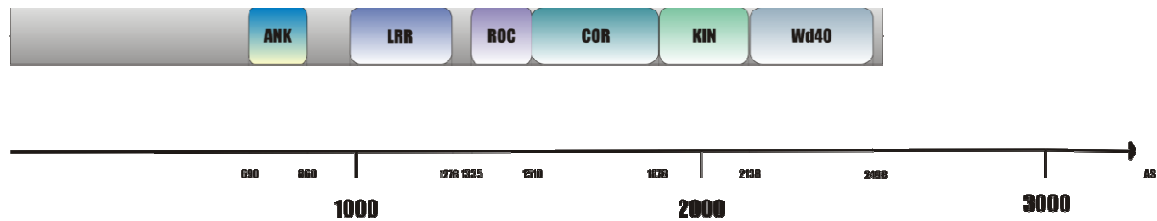


Abbildung 1.1 Schema der LRRK2-Domänenstruktur und -verteilung mit Domänengrenzen nach Mata et al., Trends in Neuroscience 2006 [14]

Die Primärstruktur des LRRK2 wird durch das Vorhandensein multipler Domänen charakterisiert. Es spielen dabei Wiederholungen (Repeats) eine Rolle, die üblicherweise als Plattform zur Organisation von Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen [13].

Die N-terminale Region des LRRK2 enthält 7 Ankyrin-Repeats. Mutationen in dieser Domäne können mit der Entwicklung von PD verbunden sein. Bei der Roc-Domäne handelt es sich um ein Mitglied der Ras/GTPase-Superfamilie. Sie ist am ehesten Mitglied der Rab-GTPasen, die sich am vesikulären Zelltransport beteiligen. Roc steht für Ras of complex proteins. Monomere GTPasen fungieren als binäre Schalter indem sie zwischen GTP-gebundener und GDP-gebundener Form wechseln. Nur die Konformation der GTP-gebundenen Form erlaubt die Bindung eines Effektors mit konsekutiver Signaltransduktion. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) binden bevorzugt an die GDP-gebundene Form und bewirken die GDP-Dissoziation mit nachfolgender Bindung von GTP (weil $GTP \gg GDP$). Der GEF für die Roc-Domäne des LRRK2 ist noch nicht identifiziert [14].

Zwischen dieser GTPase und der Kinasedomäne befindet sich eine COR-Domäne (C-terminal of Roc). Weil Roc und COR eine nichttrennbare Einheit darstellen, ist LRRK2 auch als Mitglied der ROCO-Proteinfamilie zu klassifizieren [15].

Die Leucin-reichen Wiederholungen (LRR) gehen der Roc-COR-Domäne voraus. Sie werden mit diversen Funktionen (Zelltransport, Substratbindung zur Ubiquitination, Enzyminhibition u.a.) in Zusammenhang gebracht. Protein-Protein-Wechselwirkungen spielen aber die wichtigste Rolle [8, 13]. Krankmachende Mutationen in dieser Domäne befinden sich auffälligerweise oberflächennahe und könnten Wechselwirkungen daher unterbinden [14] (siehe Abbildung 1.2.). Eine hohe negative Eigenladung der LRR-

Sequenz könnte einen Hinweis darstellen, dass negativ-geladene Moleküle (Phospholipide, Nukleinsäuren) Bindungspartner sind [14].

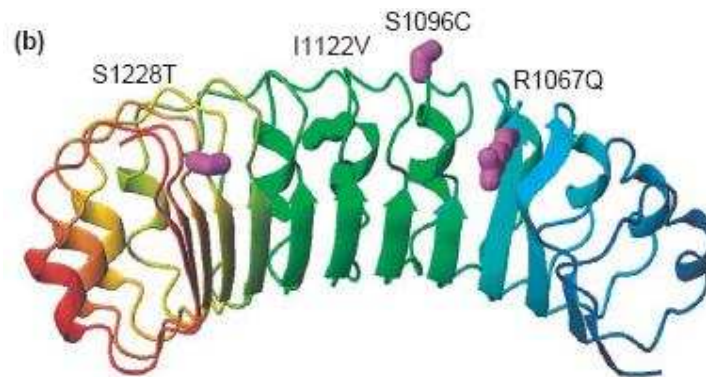


Abbildung 1.2 LRR-Domäne mit krankmachenden Mutationen. Aus: Mata et al.: LRRK2 in Parkinson's Disease: protein domains and functional insight [14]

Das Vorhandensein eines anderen Enzyms, einer katalytischen Tyrosinkinase-Domäne (MAPKKK), weist auf die Fähigkeit zur Substratphosphorylierung hin [4]. Es wird vermutet, dass die Roc-Domäne in der Lage ist, das Aktivierungssegment (s.u.) der Kinase im Sinne einer intramolekularen Signalweiterleitung zu aktivieren [12, 15, 16]. Außerdem könnten Mutationen in dieser Domäne (i.e. G2019S, I2020T) einem gain-of-function-Mechanismus folgen [4, 11, 12]. Kinasen besitzen ein Aktivierungssegment in inaktiver Konformation. In verschiedenen Kinasen besitzt dieses Aktivierungssegment ein charakteristisches Anfang und Ende (asp-phe-gly und ala-pro-glu)[4]. Onkogene Mutationen im Aktivierungssegment verursachen aktivierende Effekte. Weil G2019S das gly am Anfang des Aktivierungssegments ändert, liegt die These vom gain of function nahe. Außerdem spricht der autosomal dominante Vererbungsmodus für diese Annahme. Ein Loss-of-function würde nämlich vom 2. Allel stabilisiert werden und zu rezessiver Vererbung führen. Dennoch vermuten andere Autoren Loss-of-function-Mechanismen für dieselbe Mutation [17].

WD40-Domänen stellen die häufigste Wiederholungssequenz in humanen Proteinen dar. PD-assoziierte Mutationen fallen auch in diesen Bereich des Dardarin. Eine hohe negative Eigenladung der WD40-Sequenz könnte einen Hinweis darstellen, dass negative geladene Moleküle (Phospholipide, Nukleinsäuren) auch hier Bindungspartner sind [11].

1.2 Funktion

Die Struktur des Dardarin impliziert multiple Funktionen. Krankmachende Mutationen wurden in allen Domänen entdeckt [12]. Stets betreffen sie hochkonservierte Sequenzen [16]. Mechanismen, die von der Mutation zur Neurodegeneration führen, sind unbekannt. Veröffentlichte Daten über die Funktion von LRRK2 beschränken sich oft auf nicht-neuronale HEK293T-Zellen und sind daher physiologisch nur bedingt verwertbar [18]. In diesen Zellen wird beobachtet, dass Heat-Shock-Protein 90 (HSP90) mit der Kinase-Domäne interagiert [18]. Weil HSP90 mit dem Abbau von Proteinen bzw. der Stabilisierung des Proteasoms zu tun hat, könnte dieser Interaktion bei der Pathogenese von PD eine wichtige Rolle zukommen. Dächsel et al. konnte 13 weitere Proteine identifizieren, die mit LRRK2 interagieren [18].

Unter Proteasom-Inhibitor (MG-132) akkumuliert LRRK2. Außerdem erscheint LRRK2 mit höherem Molekulargewicht. Dieses könnte durch Polyubiquitination verursacht sein und LRRK2 daher ein Substrat des Ubiquitin-Proteasom-Pathways sein [12]. Weil auch HSP90 mit der Stabilisierung des Proteasoms zu tun hat, könnte dieser Interaktion bei der Pathogenese von PD eine wichtige Rolle zukommen.

1.2 Vorkommen

LRRK2 wird im menschlichen Gehirn auf niedrigem Niveau ubiquitär exprimiert [8]. In Gewebeproben konnte eine erhöhte Dardarin-Expression in Striatum und Substantia nigra im Vergleich zu anderen Hirnarealen festgestellt werden [8]. Demgegenüber findet sich im Gehirn der Maus ein vermehrtes Vorkommen von LRRK2 nur in dopaminrezeptiven Abschnitten (i.e. Cortex, Hippocampus, Striatum) [19]. Dopaminproduzierende Hirnareale hingegen wiesen keine Dardarinexpression auf. Daraus ergibt sich die Frage, wie ein verändertes Dardarin im Striatum zu Degeneration in der Substantia nigra führt. Reynolds et al. konnten einen retrograden, axonalen Transport von Neutrophinen zeigen [41]. Degeneration in dopaminrezeptiven Hirnarealen entstünde, wenn verändertes LRRK2 mit Neutrophinen bzw. deren Transport interferiert.

Die Expression von Dardarin ist nicht auf Zellen des ZNS beschränkt, sondern ist auch in Herz- und Lungengewebe nachweisbar [8]. Ebenso wurde endogenes LRRK2 in HEK293T-Zellen beobachtet [18].

Subzellulär wurde LRRK2 von West et al. diffus im Zytosol sowie in der äußeren Mitochondrienmembran nachgewiesen [12]. Kein Nachweis gelang in der Nukleus-Fraktion des Zellysats. Mutationen hatten keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung des Dardarin.

1.2 Familiäre Parkinsonsyndrome und LRRK2

Paisán-Ruíz und Zimprich beschrieben 2004 erste Mutationen, die mit Krankheit einhergingen. Weil mehr als 1000 Kontrollchromosomen in den Studien keine Nukleotidsubstitutionen aufweisen, handelt es sich um pathogene Mutationen, keine Polymorphismen [16]. Mindestens 20 LRRK2-Mutationen wurden inzwischen mit autosomal-dominantem IPS in Zusammenhang gebracht. Das entspricht 7 % der familiären Parkinsonerkrankungen [11, 20]. Die Kohorten, die systematisch nach LRRK2-Mutationen untersucht werden, sind einer erheblichen Verzerrung (detection bias) ausgesetzt. Daher ist es schwer, den Anteil von LRRK2-Mutationen an sporadischen PD-Fällen einzuschätzen.

Das mittlere Erkrankungsalter von LRRK2-IPS liegt bei > 50 Jahren, obwohl sehr variabel. LRRK2 verursacht folglich late-onset IPS und ähnelt diesbezüglich dem idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS).

Besonderes Interesse gilt der Gly2019Ser-Mutation. Sie ist die häufigste bisher identifizierte genetische Ursache für ein Parkinsonsyndrom (1% aller sporadischer Fälle, 5% der familiären Fälle) [21]. Die Veränderung betrifft einen wichtigen Rest der Kinase-Domäne (Abbildung 1.2).

Anhand dieser Mutation wird die Komplexität von genetisch verursachtem PD deutlich: das Erkrankungsalter schwankt zwischen 35 und 78 Jahren. In verschiedenen Familien wurde beobachtet, dass nicht alle Betroffenen die G2019S-Mutation trugen. Es gibt also andere Mechanismen (genetische Variabilität, Umweltfaktoren oder stochastische Effekte), die zur Krankheitsentwicklung beitragen [21]. Außerdem wird von Fällen berichtet, bei denen Gly2019Ser-Träger bis in hohes Alter symptomlos bleiben [22]. Interessanterweise berichtet Singleton von einem monozygoten Zwillingpaar mit einem Erkrankungsalter von 38 Jahren bei neurologisch unauffälliger Schwester (heute 62 Jahre) [21].

Bemerkenswert ist auch die Variabilität pathologischer Veränderungen: Neben typischen Parkinson-Histologien (neuronaler Verlust, Gliosis in der Substantia nigra, Lewy Bodies in

Stammhirnkernen) treten Befunde auf, die mit diffuser Lewy-Körper-Erkrankung (ubiquitäres Vorkommen der Lewy Bodies, α -Synucleinopathie), Morbus Alzheimer, progressiver supranukleärer Parese (PSP) (Tau-immunoreaktive neuronale Läsionen) oder amyotropher Lateralsklerose vereinbar sind [11, 16, 21, 22].

Diese genetische und pathomorphologische Heterogenität führt zu der Annahme, dass LRRK2 allein die Krankheit nicht verursacht (Abbildung 1.3.) Vielmehr könnten durch Dardarinmutationen Neurone in Richtung Vulnerabilität und Zelltod gelenkt werden (Priming). Tau oder α -Synuclein, aber auch Mutationen und Umwelteinflüsse, könnten als Katalysator für die Degeneration wirken [11]. Ob und wann der Schwellenwert zum Nervenzelltod erreicht wird, hängt von deren Expressionsmustern ab.

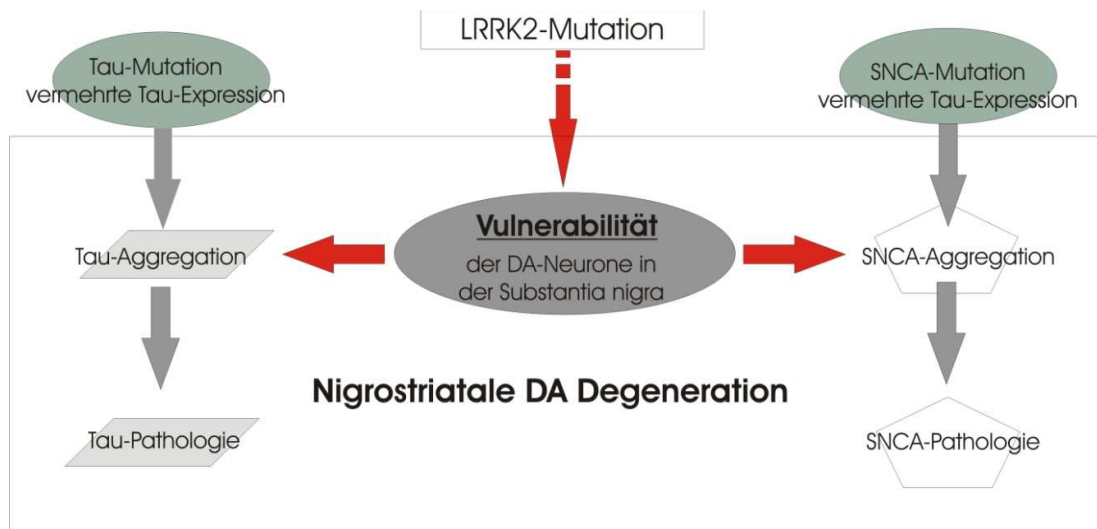


Abbildung 1.3 Modell des mutmaßlichen LRRK2-Pathomechanismus nach Singleton et al.

Es könnte also sein, dass LRRK2 eine zentrale Rolle nicht nur bei der Entstehung und Entwicklung des Idiopathischen Parkinsonsyndroms spielt, sondern als Pathogen bei neurodegenerativen Erkrankungen wirkt. Als „upstream“-Regulator multipler Signalkaskaden, könnte es Zusammenhänge zwischen Tau, α -Synuclein, Ubiquitin und anderen Proteinen aufdecken. Der Charakter dieser Zusammenhänge könnte unmittelbare Relevanz für die Therapie LRRK2-abhängiger Erkrankungen haben. Zum Beispiel könnten Erhöhung der α -Synuclein-Clearance oder Erniedrigung der α -Synuclein-Expression kompensatorische Effekte auf das LRRK2-abhängige Priming ausüben.

1.3 RNA-INTERFERENZ

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein biologischer Mechanismus der Zelle, der den Knockdown spezifischer Gene vermittelt. Die endogene RNA-Interferenz kann genutzt werden, um Genfunktionen zu untersuchen.

RNA-Interferenz (RNAi) wurde durch Arbeiten an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* im Jahre 1998 entdeckt. Beim Einbringen langer, doppelsträngiger RNA (dsRNA) wurde eine sequenzspezifische Reduktion der endogenen Genexpression beobachtet.

Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Organismen (Pflanzen, Pilze, Säugetiere) beobachtet und ihm scheint ein gemeinsamer Mechanismus zu Grunde zu liegen: das Enzym Dicer (benannt nach dem Haushaltsgerät, was Gemüse oder Fleisch „würfelt“) spaltet dsRNA in kurze doppelsträngige Fragmente (ca. 25 bp). Diese werden als siRNA bezeichnet und besitzen einen charakteristischen 2 nt-langen 3'-Überhang.

siRNA formt mit anderen Komponenten den RISC-Komplex. RISC steht für RNA-Interference Silencing Complex. Er befindet sich zumeist im Zytoplasma. Einer der beiden Stränge („guide strand“) kann komplementäre Sequenzen binden. Die RISC-Komponente „Slicer“ ist ein Argonaute-Protein mit Endonukleaseaktivität und kann diese basengepaarte Sequenzen spalten. Handelt es sich dabei um mRNA wird diese in Fragmente gespalten. Die Fragmente werden von der Zelle als fehlerhaft erkannt und abgebaut [23]. Das verhindert die Translation des Gens, für das die mRNA kodiert. Es handelt sich also um eine posttranskriptionelle Modifikation der Proteinbiosynthese [24].

Als Triggermolekül kommt exogene und endogene RNA in Betracht. Exogene dsRNA dürfte in Form von Viren am häufigsten vorliegen. Endogene Moleküle entstehen aus einem längeren Primärtranskript, welches im Genom integriert vorliegt, aber nicht für Protein codiert („genomically encoded non coding RNA“). Nach verschiedenen Reifungsschritten liegt es in Form von sog. miRNA vor, welches der RNAi-Maschinerie zugeführt werden kann. Diese endogene RNAi ist wichtig für Entwicklungsprozesse. Besonders die Unterhaltung von undifferenzierten Zellen (wie z.B. Stammzellen) wird auf die Translationsrepression durch miRNA zurückgeführt [25].

Die Entdeckung dieser biologischen Mechanismen ermöglichte auch die Anwendung in der Biotechnologie: Genfunktionen können untersucht werden, indem die Folgen des Knockdown durch RNA-Interferenz auf die Zelle beobachtet wird.

Dabei haben sich verschiedene Herangehensweisen entwickelt, mit denen der RNAi-Mechanismus anzustoßen werden soll. Lange, doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) oder kurze dsRNA-Moleküle werden eingesetzt, um den Mechanismus zu triggern. Kurze dsRNA-Moleküle sind synthetische siRNA oder endogen exprimierte Interferenzmoleküle, sog. short hairpin RNA (shRNA). Beide sind biologisch aktiven Strukturen des RNAi-Pathways nachempfunden: siRNA den Dicer-Spaltprodukten, shRNA den small temporal RNA (stRNA).

Der Nachteil beim Einsatz langer dsRNA (> 30 bp) in somatischen Zellen von Säugetieren ist das Phänomen des allgemeinen Translationssshutdown. Bei Säugetieren wirkt dsRNA nämlich durch Dimerisierung aktivierend auf Proteinkinase (PKR). PKR phosphoryliert den Initiationsfaktor EIF2 α und deaktiviert ihn. dsRNA aktiviert darüberhinaus die 2'-5'-Oligoadenylat-Polymerase, welche als Kofaktor für die nichtspezifische Ribonuclease RNaseL wirkt. Vermutlich sind diese Mechanismen als robuste Abwehr gegen (virale) dsRNA entstanden [26].

siRNA löst diese Mechanismen dank ihrer Kürze nicht aus. Tuschl et al. gelang in 2002 die erste Transfektion einer Säugetierzelle mit 21 nt langen dsRNA-Molekülen. Vermutlich imitieren diese kurzen dsRNA-Moleküle das Dicer-Produkt und werden so in den RNAi-Pathway inkorporiert [26, 27]. Somit entstand die Möglichkeit, RNAi bei Säugetieren anzuwenden, wie auch in der vorliegenden Arbeit bei Mauszellen.

Synthetische siRNA wird dabei durch Nukleofektion in die Zelle eingeschleust. Es handelt sich dabei um einen instabilen Knockdown, weil nach Verbrauch der transfizierten siRNA keine Translationsmodifikation mehr stattfindet. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit verwandt. Für andere Fragestellungen kann es interessant sein, stabile Knockdowns zu erzeugen. Sogenannte Short-Hairpin-RNA (shRNA) wird dann in das Genom integriert, nach Expression von Dicer gespalten und wirkt als Interferenzmoleküle analog den siRNAs. shRNAs bestehen aus zwei invers-komplementären Strängen von circa 70 nt Länge, welche über eine Schleife (Loop) miteinander verbunden sind. Die Sequenz entspricht nur ungefähr dem zu interferierenden GOI, sodass man von einer „imperfect base-pairing interaction“ spricht.

1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Aufklärung der molekularbiologischen Mechanismen, die zur Pathologie der spezifischen Neurodegeneration in der Substantia nigra Pars Compacta (SNpc) und somit zur Parkinsonerkrankung führen, ist mit der Hoffnung auf kausale und kurative Therapieansätze verbunden.

Mutationen im Protein LRRK2 wurden im Zusammenhang mit klinischen Symptomen beschrieben, die dem Idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS) sehr nahe kommen. So findet sich neben vielen anderen Mutationen die häufigste pathogene Mutation für das IPS im LRRK2-Gen. LRRK2 ist ein ungewöhnlich großes Protein und mit zwei Enzymdomänen ausgestattet. Seine biologische Rolle im Metabolismus der Zelle ist weitestgehend unerforscht.

In dieser medizinischen Doktorarbeit soll daher versucht werden, die biologische Funktion des LRRK2 in einem dopaminergen Mauszellmodell näher zu beschreiben. Hierfür soll die genetische Aktivität des LRRK2 in mesenzephalen, sogenannten MN9D-Zellen reduziert werden, indem der Mechanismus der RNA-Interferenz *in vitro* durch Transfektion von siRNA angestoßen wird. Durch die Reduktion der LRRK2-Aktivität sollen Veränderungen in den MN9D-Zellen induziert und diese objektiviert werden.

Eine Hypothese zum Mechanismus der Neurodegeneration beim Morbus Parkinson wurde durch die Experimente von Höglinger et al [40] vorgestellt, in denen eine Aktivierung des Zellzyklus in menschlichen IPS-Zellen gezeigt wurde. Durch Vergiftung von dopaminergen Neuronen mit MPTP wurde im Mauszellmodell eine Erhöhung von Markern der Proliferation und des Zellzyklus (PCNA, BrdU, Zyklin D₁ und weiteren) nachgewiesen.

Die Darstellung der Beobachtungen konzentriert sich aus diesem Grund auf die transkriptionelle Expression von Genen des Zellzyklus (Zykline, Zyklin abhängige Kinasen, Inhibitoren der Zyklin abhängigen Kinasen und andere) sowie der neuralen und dopaminergen Differenzierung (Tyrosinhydroxylase, Nestin und andere) durch PCR. Die Proliferation der Zellen vor und nach den RNA-Interferenzexperimenten soll global durch MTT- und BrdU-Test gemessen werden.

2 Material

2.1 ZELLKULTUR

Die Versuche wurden mit MN9D-Zellen durchgeführt, welche dem neurologischen Labor freundlicherweise durch Alfred Heller von der University of Chicago zur Verfügung gestellt wurden. Dabei handelt es sich um eine Hybridzelllinie aus embryonalen, ventralen mesenzephalen Zellen und Neuroblastomazellen der Maus [28]. Die Zellen sind TH-immunoreaktiv, weisen TH-mRNA auf und transportieren und emittieren Dopamin. Es konnte gezeigt werden, dass die dopaminergen Eigenschaften der MN9D-Zellen in Abhängigkeit vom neuronalen Umfeld variieren, sie also mit inhibitorischen und exzitatorischen Reizen interagieren [28]. Trotz dieser dopaminergen Charakteristika, besitzen MN9D-Zellen im undifferenzierten Zustand eine nichtneuronale Morphologie mit runden Zellleibern und fehlenden Fortsätzen. Nach der Differenzierung mit Forskolin verändert sich dieses Aussehen und es kommt zur Ausgestaltung von Fortsätzen sowie einer elektrophysiologischen Annäherung der MN9D-Zellen an dopaminerge Neurone [29]. Obwohl z.T. beträchtliche Unterschiede in der elektrischen Erregbarkeit bestehen bleiben, werden MN9D-Zellen vielfach benutzt, um Mechanismen bei der Pathogenese des IPS zu testen.

Für die Versuche kamen Zellen zwischen der 7. und 14. Passage zum Einsatz. Nach der 14. Passage wurden die Zellen verworfen, sodass Veränderungen der Proliferation nicht auf eine replikative Zellseneszenz zurückführbar sind.

2.2 INSTRUMENTE

Instrumente	<i>Hersteller</i>	<i>Kennzeichnung</i>
Sterilbank	Heraeus, Berlin	Hera safe
Zentrifuge, klein	Heraeus, Berlin	Biofuge primo
Zellinkubator	Heraeus, Berlin	Hera cell 150
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg,	CKX 41
Elektrophorese: Netzteil	Consort, Turnhout, Belgium	E865
Fluoreszenzmikroskop	Modulation Optics	Axiovert 35
Plate Reader	Tecan, Crailshaim	Sunrise
Zentrifuge, groß	Eppendorf, Eppendorf	Centrifuge 5810R
RT-PCR	Stratagene, La Jolla, USA	Mx3000P
Tiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Hera freeze
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg	Thermomixer Comfort
Rotator	Biometra, Göttingen	OV3
Vortexer	GLW, Würzburg	L46
Wasserbad	Julabo, Seelbach	SW22
Elektrophoreseapparat	Bio-Rad, Hercules, USA	Mini-Protean II
Nukleofektor	Amaga, Gaithersburg, USA	Nucleofector Device II
ELISA-Reader	Tecan, Switzerland	Sunrise

Tabelle 2.1 Instrumente

Andere allgemeine Laborgeräte (Pipetten etc.) wurden benutzt.

2.3 VERBRAUCHSMATERIAL

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Kennzeichnung
6-well-Platte	TPP, Trasadingen, Switzerland	
96-well-Platte	Nunc, Roskilde, Dänemark	Nunclo TM sterile
Fließpapier	Schleicher & Schull, Dassel	
Membran (Western Blot)	Schleicher & Schull, Dassel	Protran BA 85
Röntgen-Film	Kodak, Stuttgart	T-Mat Plus DG Film
Zellkulturflasche mit Filter	Greiner bio-one, Frickenhausen	Cellstar [®]

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterial

Andere alltägliche Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen etc.) wurden benutzt.

2.4 KITS UND FERTIGLÖSUNGEN

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockfort, USA
Brilliant [®] SYBR [®] Green QRT-PCR-Master-Mix	Stratagene, La Jolla, USA
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer, Boston, USA
Rneasy [®] Mini Kit	Qiagen Science, Hilden
QIAshredder [®]	Qiagen Science, Hilden
Mouse Cell Line Nucleofector [®] Kit mit GFP-Plasmid	Amara, Gaithersburg, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche, Penzberg

Tabelle 2.3 Kits

2. Material

Fertiglösung	<i>Hersteller</i>
30% Acrylamid/Bisacrylamid solution	Roth, Karlsruhe
PBS, sterile	Gibco BRL, Tulsa, UK

Tabelle 2.4 Fertiglösungen

2.5 CHEMIKALIEN

Chemikalie	<i>Hersteller</i>
APS	Bio-Rad, Hercules, USA
DTT	Roche, Mannheim
Forskolin	Sigma, St. Louis, USA
Glycerine	Roth, Karlsruhe
Glycine	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Protease Inhibitor Cocktail tablets	Roche, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20®	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA

Tabelle 2.5 Chemikalien

2.6 STOCKLÖSUNGEN UND MEDIUM

Stocklösung	Formel
10% APS	10g per 100 ml ddH ₂ O
5 x Blotting Buffer	240 mM Tris 195 mM Glycine 0,19% SDS
2 x Lämmli blue-Puffer	125 mM Tris-HCl (pH=6,8) 4% SDS 20% Glycerine 0.04% Bromphenol Blue
10% Lämmli-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 3,5 mM SDS
10% SDS	10g per 100 ml ddH ₂ O

Tabelle 2.6 Stocklösungen

Mediumkomponente	Menge	Hersteller
DMEM-Pulver-Medium	89%	Sigma, St. Louis, USA
FCS	10%	Sigma, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	1%	Gibco, Tulsa, UK

Tabelle 2.7 Mediumkomponenten

2.7 PRIMER

Gen	Primer- name	Sequenz (5' → 3')	Genbank- Accession #	Fragment -länge (bp)
LRRK2	LRRK2 / 3	Fwd=CCAAGCAGAGCAAGCAAAG Rev=GGCGTACTGACATCGCCTAT	NM02573 2	136
HMBS	HMBS	Fwd=TCGGGGAAACCTCAACACC Rev=CCTGGCCCACAGCATACAT	NM01355 1	144
GFP	pmaxGF P-1	Fwd=GTGATGGGCTACGGCTTCTA Rev=GTACTTCTCGATGCGGGTGT		111
Tubulin	TUJ1	Fwd=TGAGGCCTCCTCTCACAAGT Rev=TAAAGTTGTCGGGCCTGAAT	NM02327 9	116
Nestin	Nes	Fwd=TGGAACAGAGATTGGAAGGC Rev=TCTTGAAGGTGTGCCAGTTGC		
TH	THUlm _neu	FWD=GCCTTCCGTGTGTTTCAGTG Rev=GGCAAATGTGCGGTCAGC	NM00937 7	
Ki-67	Ki-67/3	Fwd=AAGCAGCAGCAGATGAGTGA Rev=TCTCCCAAAATCTCTGTGGTG	X82786.1	125
CDKN1 A	CDKN1 A/2	Fwd=TGTCGCTGTCTTGCACTCTG Rev=AATCTGTCAGGCTGGTCTGC	NM00766 9	
RPA3	RPA3/1	Fwd=GGCAGAATCATGGAGGACATA Rev=CAGTGGGATGAATCTTTTCCA	NM02663 2	121
PCNA	PCNA/ 2	Fwd=AACCTGCAGAGCATGGACTC Rev=TTTGGACATGCTGGTGAGG	NM_0110 45	126
CCND1	CCND1	Fwd=TGCTGCAAATGGAAGTCTGCT Rev=CTCTGGCATTTTGGAGAGGA		101

Tabelle 2.8 Primer

2.8 ANTIKÖRPER

<i>Hersteller</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Host</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Katalog- Nummer</i>
Novus	LRRK2	Rabbit	1:1000	NB300-267

Tabelle 2.9 Antikörper

2.9 ENZYME

Enzym	<i>Hersteller</i>
DNase	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma, St. Louis, USA

Tabelle 2.10 Enzyme

2.10 MOLEKULARGEWICHTSMARKER PROTEIN

Markerprotein	<i>Hersteller</i>
Magic Mark™ XP Western Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Prestained Protein, Broad Range	New England BioLabs, Frankfurt a. M.

Tabelle 2.11 Molekulargewichtsmarker

3 Methoden

3.1 FLUSSDIAGRAMM DER EXPERIMENTE

In der Abbildung 3.1 ist der Ablauf sowie die zeitliche Beziehung der Experimente graphisch dargestellt. MN9D Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle-Medium (DMEM) für 24 Stunden kultiviert, mit 200µl Forskolin versetzt und für weitere 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden dann von der Mikrotiterplatte abgelöst und durch Elektroporation mit siRNA und GFP transfiziert. Nach 48h und 72h wurden die Zellen geerntet, um Effekte der Transfektion zu messen. In einem ersten experimentellen Zweig wurde die RNA der Zellen isoliert, in DNA umgeschrieben und auf ihren mRNA-Gehalt in der Polymerasekettenreaktion untersucht.

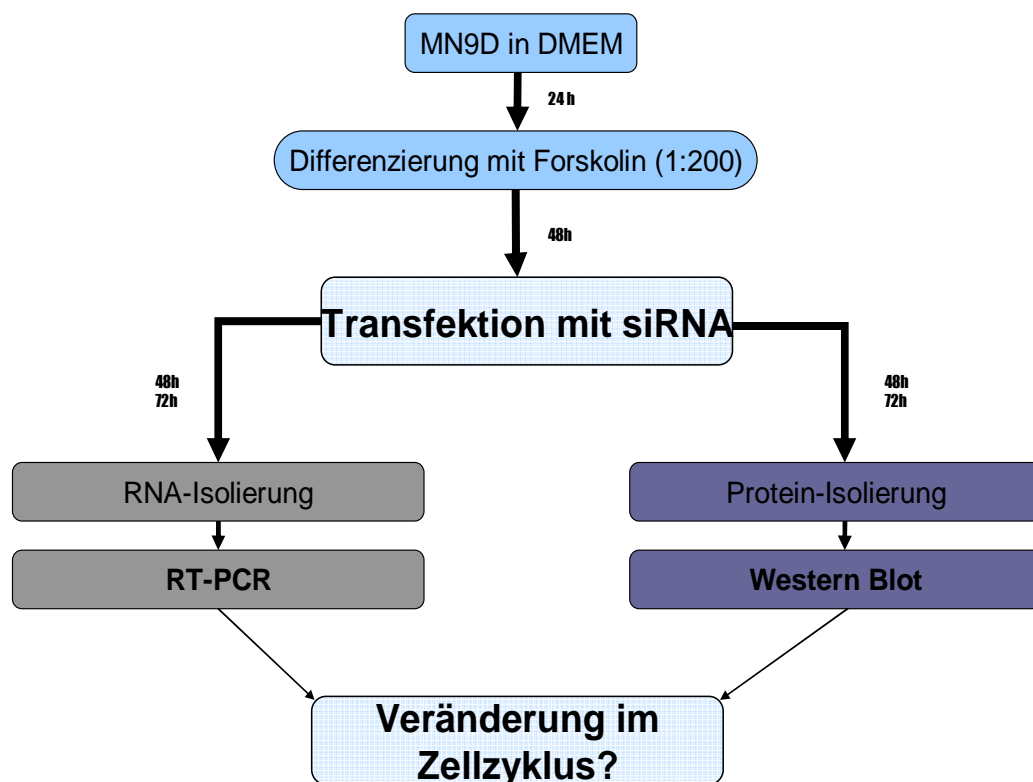


Abbildung 3.1 Flussdiagramm der Experimente

Um den Proteingehalt der Zellen zu bestimmen, wurde in einem zweiten experimentellen Zweig ebenfalls nach 48h und 72h das Gesamtproteinlysate der Zellen gewonnen, die Konzentration bestimmt und durch Gelelektrophorese aufgetrennt sowie im Western Blot dargestellt.

Es wurden nur solche Zellen experimentell genutzt, deren LRRK2-Knockdown mit größer 50% gegenüber der Kontrolle bestimmt wurde.

3.2 ZELLKULTUR

Die MN9D-Zellen wurden im Brutschrank kultiviert (37°C; 5% CO₂; 21% O₂). Das verwendete Medium ist Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Dabei handelt es sich um ein Zellkulturmedium, welches Aminosäuren, Salze, Glucose und Vitamine enthält. Es ist für die meisten Zelltypen von Mensch, Ratte, Hamster, Affe oder eben Maus geeignet.

Bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen geteilt und mit frischem Medium in 2 oder 3 neue Zellkulturflaschen verteilt (gesplittet). Dabei wurde altes Medium entfernt, mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und die Zellen mittels EDTA-Trypsin von der Flasche abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mit frischem DMEM gestoppt und die suspendierten Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Für die Versuche kamen Zellen zwischen der 7. und 14. Passage zum Einsatz. Die Zellen wurden verworfen, wenn sie die 14. Passage erreicht hatten oder mehr als 20% der Zellen abgestorben waren. So sollte verhindert werden, dass Veränderungen der Proliferation aufgrund replikativer Zellseneszenz („Hayflick limit“) geschehen.

3.3 NUKLEOFEKTION

Bei der Transfektion gelangen Moleküle in das Innere von eukaryotischen Zellen. Nukleofektion bezeichnet den Transport in den Zellkern. Eine Methode zur Nukleofektion ist die Elektroporation. Ein elektrisches Feld generiert eine Erhöhung der Leitfähigkeit und Permeabilität der Plasmamembran. Übersteigt die Stärke des elektrischen Feldes die Durchschlagsfestigkeit der Zellmembran, kommt es zur Porenbildung. Durch diese Poren gelangen extrazelluläre Moleküle in den Intrazellularraum. Durch geeignete

Programmwahl wird Dauer und Stärke des elektrischen Feldes so gewählt, dass es zum Verschluss der Poren nach kurzer Zeit und nicht zur Auslösung des Zelltods kommt.

Die MN9D-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60-80 % mit 100 µl 5 mM Forskolin und frischem Medium versetzt. Forskolin ist ein Phosphodiesterasehemmer. Über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt es zur Differenzierung in Neurone. Die differenzierten Zellen wurden nach 48 h dem Experiment zugeführt und vorsichtig mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst. Nachdem die Proteinase mit DMEM gestoppt wurde, konnten die Zellen mikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer nach folgender Formel gezählt werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellen}}{\text{Großquadrat}} \cdot 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{16 \text{Kleinquadrate}} \cdot 10^4$$

Pro Nukleofektionsprobe waren zwischen 1×10^6 und 5×10^6 Zellen zu verwenden. Diese Zellen wurden mit siRNA und Nucleofector™ Solution zusammengebracht und in eine Küvette mit Aluminiumelektroden überführt. Das elektrische Feld wurde mit dem Nucleofector Device II von Amaxa im Program A – 020 generiert. Schließlich wurde die Zelllösung mit einer speziellen Amaxa-Küvette in eine 6-well-Platte gebracht und bei 37° C in 2 ml DMEM kultiviert.

Um LRRK2 herunterzuregulieren, wurden 5µl LRRK2-siRNA verwendet. Dabei handelt es sich um ein 25 Nt langes Stück doppelsträngiger RNA, welches komplementär zu einer Sequenz des LRRK2-mRNA-Moleküls ist. Als Kontrolle wurde der Hälfte der Zellen in einer separaten Versuchslinie 5µl eines control-siRNA-Moleküls transfiziert. Dieses ist ohne wechselseitige Entsprechung (Komplementarität) zu muriner mRNA. Somit entstehen zwei experimentelle Äste (Abbildung 3.2): Zellen mit LRRK2-siRNA Knockdown werden im Folgenden als Knockdowngruppe oder kurz „ko“ bezeichnet. Die mit control-siRNA nukleofizierten sollen fortan als Kontrollgruppe oder „control“ bezeichnet werden.

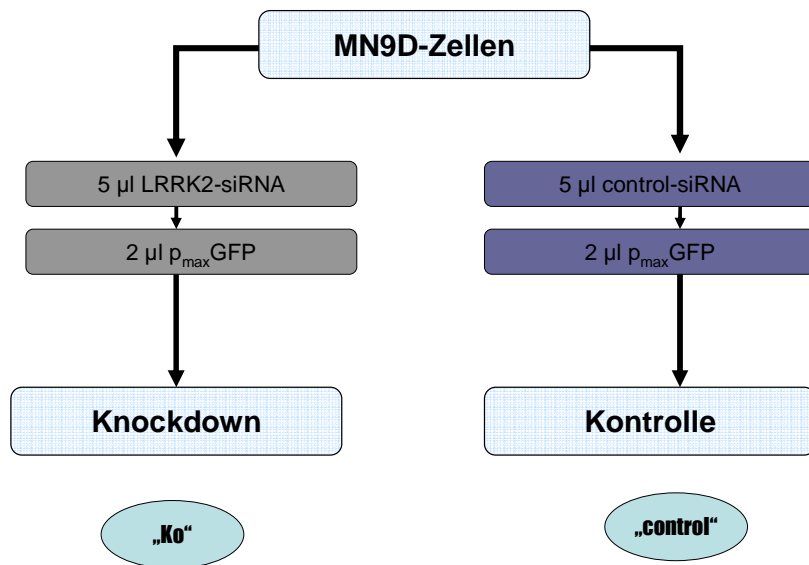


Abbildung 3.2 Versuchsaufbau

Alle übrigen Parameter des Experiments waren in beiden experimentellen Ästen identisch, sodass der einzige Unterschied zwischen „ko“ und „control“ in der verwendeten siRNA bestand.

3.4 MIKROSKOPIE TRANSFIZIERTER ZELLEN

Um die Transfektionsrate abzuschätzen wurde je 2µl GFP-Vektor pro Probe mitgeführt (Abbildung 3.2). Das Green Fluorescent Protein (GFP) wurde 1962 in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und von Shimomura identifiziert. Der Einbau in das Genom eines Organismus und dessen Nutzung als biologischem Marker glückte als Erstem Dr. Chalfie. Beide erhielten für diese Entdeckungen den Nobelpreis für Chemie im Jahre 2008. Weil der GFP-Vektor größer als die siRNA-Moleküle ist, sollte jede fluoreszierende Zelle auch mit siRNA nukleofiziert sein.

48h bzw. 72h nach der Transfektion wurden die Zellen im Mikroskop betrachtet und mit Blaulicht (Bandpassfilter $514 \text{ nm} < \lambda < 546 \text{ nm}$) angeregt. Die Grünlicht-Fluoreszenz der transfizierten Zellen wurde mit dem Gesamtlicht des gleichen Bildausschnittes überlagert,

so dass über das Verhältnis aus fluoreszierenden zu nicht-fluoreszierenden Zellen die Transfektionsrate abgeschätzt werden konnte.

3.5 MTT-TEST

Der MTT-Test dient der Quantifizierung der Proliferation und Lebensfähigkeit einer Zellkultur. Er basiert auf der Spaltung des gelben Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in lilafarbene Formazankristalle. Der Spaltung liegt eine Reduktion zugrunde, die auf $\text{NADH} + \text{H}^+$ bzw. $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Coenzym angewiesen ist. Daher korreliert die Umwandlung des MTT in Formazan mit der Menge lebender, metabolisch aktiver Zellen. Die gebildeten Formazankristalle werden verflüssigt und die resultierende, gefärbte Lösung am ELISA-Reader quantifiziert. Das Formazansalz besitzt ein Absorptionsmaximum bei ca. 580 nm. MTT hingegen besitzt ein anderes UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 480 nm. Auf diese Weise wird die Proliferation im Sinne von Zellteilung *indirekt* gemessen.

Nach der Nukleofektion wurden je 10 µl ko- und control-Zellen auf 96-well-Platten aufgetragen und für 48h bzw. 72h im Brutschrank kultiviert. Jedes Well wurde auf ein finales Volumen von 100µl Medium gebracht. Nach dieser Inkubationsperiode wurden pro Well 10 µl MTT aus dem Cell Proliferation Kit I hinzugefügt und für weitere 4h bei 37° C inkubiert. Eine „low control“ ohne MTT wurde jeweils für ko- und control-Zellen mitgeführt. Als „negative control“ wurde MTT in ein zellfreies Well gebracht. Nachdem die lilafarbenen Formazankristalle sichtbar ausgefallen waren, wurde 100µl einer Solubilisierungslösung hinzugefügt und im Brutschrank übernacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Lösung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550nm in einer Endpunktmessung analysiert. Als Referenzwellenlänge wurden 690nm verwendet. Zur Homogenisierung der Lösung wurden die Proben für 30s geschüttelt. Nach einer 15 sekundigen Setzzeit wurde die Photometrie durchgeführt. Alle Parameter wurden in der Software Magelan 5 definiert und für alle Wiederholungen identisch wiederverwandt. Die Absorption wird als Differenz nach Abzug von low control und negative control sowie eines Leerwertes („blanc“) angegeben.

3.6 BRdU PROLIFERATIONS-ELISA

Der Bromdesoxyuridin-Proliferations-ELISA ist neben dem in 3.4. beschriebenen MTT-Test ein weiterer Test zur Bestimmung des Zellzahlwachstums von Zellkulturen. Das Testprinzip besteht in der Einlagerung von Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle Thymidin in die DNA sich teilender Zellen. BrdU kann durch einen anti-BrdU-Antikörper spezifisch gebunden und über eine Substratreaktion quantitativ am Photometer bestimmt werden. Die gemessene Absorption entspricht dem Einbau von BrdU in die DNA und damit der DNA-Synthese der Zellkultur, welche ein *direktes* Surrogat der Proliferation darstellt.

Nach der Transfektion mit siRNA wurden die Zellen in einer 96-well-Platte in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Well kultiviert und mit 10 µl BrdU versetzt. Eine „low control“ ohne BrdU wurde jeweils für ko- und control-Zellen mitgeführt. Als „negative control“ wurden 10 µl BrdU in ein zellfreies Well gebracht. Nach 24h Inkubationszeit wurde die BrdU-Markierungsreaktion gestoppt, die Zellen fixiert und denaturiert, um die DNA der folgenden Antikörperreaktion leichter zugänglich zu machen. Diese wird durch Zugabe von 100 µl anti-BrdU-Antikörperlösung gestartet und nach 90 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch 3 Waschschrte mit PBS beendet. Anschließend wurde die Substratlösung zugegeben, die durch Reaktion mit dem anti-BrdU-Antikörper einen Farbumschlag verursacht. Dieser war nach 20 Minuten stets deutlich und wurde mit 25 µl 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde am Tecan Sunrise photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm in einer Endpunktmessung bestimmt. Die Referenzwellenläng war 690 nm. Alle Parameter wurden in der Software Magelan 5 definiert und für alle Wiederholungen wiederverwandt. Die Absorption wird als Differenz nach Abzug von low control und negative control sowie eines Leerwerts (blanc) angegeben.

3.7 RNA-ISOLIERUNG

Zur RNA-Isolierung stand das RNeasy® Mini Kit von Qiagen zur Verfügung. Bei diesem System werden die biologischen Proben in einem Guanidin-Thiocyanat-Puffer (RLT-Puffer) lysiert und homogenisiert. Durch den Einsatz von β-Mercaptoethanol werden die RNasen inaktiviert. Der Einsatz des sogenannten „QIAshredders“ reduziert die Viskosität der Probe, indem er feste Bestandteile bindet. Die RNA wird nicht von der Membran

gebunden, passiert diese und wird dann mit salzhaltigen Puffern zusammengebracht, damit diese die Wasserstoffbrückenbindungen lösen und so die dreidimensionale Struktur der RNA aufheben. In dieser hydrophoben Umgebung wird die RNA-Lösung mit einer Silikatmembran zusammengebracht, die die beste Bindungsstelle für das RNA-Molekül darstellt. Es können nur RNA-Moleküle länger als 200 Basen an die Silikatmembran gebunden werden. Bis zu 100 µg RNA können so gewonnen werden.

Die Schritte wurden gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Waschschrift mit RNase-freier DNase implementiert, um den DNA-Gehalt der Lösung zu reduzieren. Schließlich wurde die isolierte RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Membran gelöst und bei –80° C nicht länger als 21 Tage gelagert.

3.8 qRT-PCR

Zur Analyse der Genexpression stand das Mx3000P der Firma Stratagene zur quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit Reverser Transkriptase-Reaktion zur Verfügung (RT-qRT-PCR). Die PCR ist ein Verfahren, um Desoxyribonukleinsäuren (DNA) zu vervielfältigen. Die DNA-Probe muss dafür mit Primern, Nukleotiden, Ionen und einer hitzestabilen DNA-Polymerase zusammengebracht werden. Die Steuerung der sich wiederholenden Syntheszyklen wird vollautomatisch durch den Mx3000P vollzogen.

Zum Erfassen der Quantifizierung der Genexpression in Echtzeit wird von Stratagene der Brilliant® SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit angeboten. Neben Nukleotiden, Pufferlösungen, Reverser Transkriptase, TaqPolymase ist SYBR® Green I als Farbstoff im Lieferumfang enthalten. Die genaue Zusammensetzung der Reaktionsbestandteile ist in Tabelle 3.1 angegeben.

Die PCR wird durch den Zusatz von SYBR® Green I – Farbstoff quantitativ, denn er bindet nicht-spezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA) und fluoresziert nur in diesem Zustand, während gelöster Farbstoff nur wenig Fluoreszenzsignal emittiert. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge doppelsträngiger DNA. Damit das SYBR® Green an der dsDNA binden kann, muss in einem ersten Schritt die Umwandlung der isolierten RNA in DNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) erfolgen. Diese wird anschließend denaturiert und liegt dann als Einzelstrang (ssDNA) vor. Es kommt durch die Anwesenheit spezifischer Primer zur Hybridisierung mit der Zielsequenz („Annealing“) und durch die

Aktivität der hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) wird ein doppelsträngiges Amplikon synthetisiert. Dieses erlaubt die Bindung des Farbstoffs und es kommt zum Anstieg der Fluoreszenz.

Reaktionsbestandteil	Volumen in μl
H ₂ O	9,5
SYBR-Mastermix	12,5
RNA	1
RT-Mix	0,0625
Primer, FWD, 5 mmol/l	1
Primer, REV, 5mmol/l	1

Tabelle 3.1 Zusammensetzung des Reaktionsmix für die RT-PCR

Im Zuge der PCR-Zyklen (Tabelle 3.2) schreitet die Vervielfältigung der dsDNA weiter fort, was mit einer immer größeren Fluoreszenz-Intensität einhergeht. Um diesen Anstieg graphisch darzustellen, wird die Fluoreszenz logarithmisch über dem PCR-Zyklus aufgetragen. Man definiert einen Schwellenwert für die Fluoreszenz und erhält mit dem dazugehörigen Zyklus den Schwellenwertzyklus „Ct“ (threshold cycle). Der Schwellenwert ist der Fluoreszenzwert, der statistisch signifikant über unspezifischer Vervielfältigung (Primer-Dimere etc.) liegt und bei dem die Vervielfältigung exponentiell erfolgt. In der logarithmischen Skalierung entspricht das einem linearen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Je mehr DNA initial vorlag, desto eher ist der C_T-Wert erreicht: die DNA-Menge ist indirekt proportional zum Ct-Wert. Da die RNA im Verhältnis 1:1 in DNA umgewandelt wurde, eignet sich der Ct-Wert, quantitative Aussagen über die mRNA in der Zellkultur zu treffen. Die Quantifizierung durch den Schwellenzyklus Ct ist genauer als eine Endpunktmessung der Fluoreszenz, weil Unterschiede in der Zusammensetzung der Reaktionskomponenten sowie deren begrenzte Verfügbarkeit im Reaktionsgemisch keinen Einfluss auf die ermittelte Kopienzahl der mRNA hat.

Zyklen	Dauer	Temperatur	Beschreibung
1	25´	50° C	Umschreiben in DNA
1	15´	95° C	Inaktivierung der RT
45	15s	94° C	Denaturieren
45	20s	55° C	Annealing
45	30s	72° C	Elongation
1	1´	95° C	Denaturieren
1	30s	55° C	Annealing (Schmelzkurve)
1	30s	95° C	Aufnahme der Schmelzkurve

Tabelle 3.2 Zykluseinstellungen für die RT-PCR

Um die Spezifität des Amplikon zu überprüfen wird nach dessen Vervielfältigung eine Dissoziationskurve erstellt, bei der der Schmelzpunkt des PCR-Produktes bestimmt wird. Der Schmelzpunkt eines Amplikons ist erreicht, wenn das Fluoreszenzsignal plötzlich abfällt, was dem Übergang der dsDNA in ssDNA entspricht. Weil die Denaturierung des PCR-Produktes temperaturabhängig ist, besitzen Amplikons gleicher Länge gleiche Schmelztemperaturen.

Um Unterschiede in der Gesamtmenge der eingesetzten RNA zu berücksichtigen, wurde die Genexpression des GOI (Gene of Interest) mit einem Haushaltsgen (House-Keeping-Gene, HKG) ins Verhältnis gesetzt. Als HKG wurde Hydroxymethylbilansynthase (HMBS) verwendet. Zu den Anforderungen an ein HKG zählt eine unregulierte, d.h. eine unter allen Versuchsbedingungen konstante Expression. Weil LRRK2 ein erwartungsgemäß wenig exprimiertes Protein darstellt, war es außerdem von Bedeutung, ein Haushaltsgen mit ebenfalls niedriger Expression zu wählen, um die ΔC_T -Werte nicht zu groß werden zu lassen. HMBS wurde 2002 von Kühne et al. als HGK eingeführt und durch Stefan Liebau in seinen Eigenschaften bestätigt und daher bei diesen Versuchen eingesetzt [30, 31].

Zur Auswertung von quantitativen RT-PCR-Daten stehen als Methoden die relative und absolute Quantifizierung zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung angewandt. Die absolute Quantifizierung bestimmt die initiale Kopienzahl des Transcript of Interest (TOI), indem es das PCR-Signal mit Standardkurven vergleicht. Bei der relativen Quantifizierung wird die Veränderung der Expression des TOI auf eine Referenzgruppe bezogen. Als Referenzgruppe im Experiment dient die mit control-siRNA

behandelte „control“-Gruppe (siehe Abbildung 3.2). Die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ - Methode eignet sich dazu und lautet [32]:

$$rel.Genexpression = \frac{2^{C_T(HKG)-C_T(GOI)_{ko}}}{2^{C_T(HKG)-C_T(GOI)_{ctrl}}} (1)$$

bzw.

$$\Delta C_{Tcontrol} = C_T(GOI) - C_T(HKG)$$

$$\Delta C_{Tknockdown} = C_T(GOI) - C_T(HKG)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{Tknockdown} - \Delta C_{Tcontrol}$$

$$relativeGenexpression = 2^{-\Delta\Delta C_T} (2)$$

Vorausgesetzt ist, dass die Amplifikationseffizienz für TOI und HKG identisch ist. C_T -Werte größer als 35 besitzen keine Gültigkeit, weil dann die initiale Kopienzahl des untersuchten mRNA-Moleküls zu gering ist.

3.9 WESTERN BLOT

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung von Proteinen auf eine Membran und deren anschließenden Nachweis. Aus einer Zellpopulation müssen dazu zunächst die Proteine isoliert werden. Im elektrischen Feld kann das gewonnene Proteinkonzentrat der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran übertragen werden. Durch geeignete Antikörper können dann spezifische Proteine detektiert und über Substratreaktionen sichtbar gemacht werden.

3.9 Proteinisolierung

Nach der Nukleofektion wurden die Zellen für 48h oder 72h kultiviert und anschließend vorsichtig mit PBS von der 6-Well-Platte abgespült und in Eppendorf-Tubes überführt, um sie bei 6500 U/min für 2 Minuten zu zentrifugieren. Das Pellet wurde mit zunächst 50 µl 1x Lämmli-Puffer mit Proteinase-Inhibitor versetzt. Durch An- und Absaugen mit der Pipette wurden die Zellen zerrieben und die Proteine freigesetzt. Gegebenenfalls wurde mehr 1 x Lämmli-Puffer mit Proteinaseinhibitor zugesetzt, um die Lösung zu homogenisieren.

3.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits der Firma Pierce durchgeführt. Die Arbeitsschritte wurden gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt.

Das Kit nutzt in einem ersten Schritt die Biuretreaktion. Dabei wird in Anwesenheit von Peptidbindungen Cu^{2+} zu Cu^+ bei alkalischem pH-Wert reduziert. Das entstehende Kupferkation wird dann mit Bichinoninsäure (BCA) nachgewiesen. Der Chelatkomplex aus 2 BCA und Cu^+ ist lilafarben, wasserfest und weist eine Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm auf. Die Menge dieses Chelatkomplexes ist direkt proportional zur Proteinkonzentration, genauer zum relativen Vorkommen von Cystin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan im Eiweiß. Die Absorption wurde bei 562 nm mit dem Sunrise Plate Reader der Firma Tecan gemessen. Zur Umwandlung von Absorptionswerten in Konzentrationsangaben wurde eine Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) genutzt, welche durch die Firma Pierce mit konstanten Proteinkonzentrationen angeboten wird. Aus den Proteinkonzentrationen wurden diejenigen Volumina berechnet, die gleiche Massen enthielten. Das ermöglicht den Vergleich der Signalstärke auf dem Blot mit Rückschluss auf die Menge des untersuchten Proteins.

3.9 Herstellung der Proben

Bei der reduzierenden SDS-PAGE wird Dithiothreitol (DTT) eingesetzt, um durch Reduktion der Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten die Proteine in Untereinheiten zu zerlegen. Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an diese Untereinheiten und maskiert mit seiner negativen Ladung die Nettoladung der Proteine. Die Anlagerung von SDS erfolgt in einem konstanten Verhältnis von 1,4g/g Polypeptid. Daher ist die Ladung pro Längeneinheit des Polypeptids nahezu konstant. Im Ergebnis bewegt sich das Protein im elektrischen Feld als Funktion des Logarithmus seines Molekulargewichts und unabhängig von seiner Nettoladung.

Die so hergestellten Proteinproben wurden kurz durchmischt, um dann der Konzentrationsbestimmung entsprechend in ein Eppendorf-Tube vorgelegt zu werden. In jedem Slot des Sammelgels befindet sich so die gleiche Masse Protein (i.e. 30 µg). Jede Probe wird dann auf ein finales Volumen von 30 µl mit 2 x Lämmli blue und DTT gebracht. Die gleiche Mixtur wurde mit 15 µg Molekulargewichtsmarker (Magic Mark) benutzt. Die Proben (exklusive Magic Mark) werden für 5 Minuten im Thermocycler bei

95° C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis werden sie kurz zentrifugiert und auf das equilibrierte Sammelgel aufgetragen.

3.9 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ihrer Länge nach aufgetrennt. Man unterscheidet 3 Ladungsträger: Glycin im 1 x Lämmli-Laufpuffer in der Elektrophoresewanne, Cl^- im Probenpuffer und Sammelgel sowie SDS, welches am Protein gebunden ist. Glycin ist im Laufpuffer (pH = 8.8) negativ geladen und fungiert als Ladungsträger bis es in das Sammelgel (pH = 6.8) eintritt und zum ungeladenen Teilchen wird. Hier schirmen Chlorid-Anionen das SDS-besetzte Protein ab. Weil sie als Ladungsträger größter Mobilität in Richtung Katode (negative Elektrode) bewegt werden, setzen sie die SDS-besetzten Proteine schrittweise dem elektrischen Feld aus. Weil die sich näher am Trenngel befindlichen Proteine noch vom Chlorid „beschützt“ werden, bewegen sich diese langsamer als die freien. Dieses Phänomen sowie das Verhalten der Proben an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel bewirken die Konzentration der aufgetragener Proteine in der Lauffront (d = 1 mm). Sobald der Proteinmix das Trenngel erreicht, ist das Molekulargewicht entscheidend für die Beweglichkeit des Proteinmoleküls. Dies beruht auf dem Siebeffekt des Resolving Gel. Die Verwendung eines „dünnen“ Siebs (6 %iges Trenngel) begünstigt dabei die Beweglichkeit eines großen Proteins wie LRRK₂ (M = 280 kDa). Je größer das Protein, desto langsamer die Beweglichkeit im Trenngel.

Zum Gießen eines starren Gels benötigt man Acrylamid zur Polymerisation und N, N-Methylenbisacrylamid zur Quervernetzung. Als Katalysator der Reaktion wird Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Ammoniumpersulfat (APS) stellt der Polymerisation SO_4^- - Radikale zur Verfügung und initiiert sie. Es dauert circa 15 Minuten bis das Gel erstarrt. Der erste Schritt bei der Herstellung eines Gels besteht dabei aus der Reinigung der Elektrophoresekammer mit Alkohol und deionisiertem Wasser. Nach dem Zusammenbau der Gelelektrophoresekassette wird das Trenngel hergestellt. Dessen Zusammensetzung ist in der Tabelle 3.3 ersichtlich. Zuletzt werden APS und TEMED hinzugefügt und so die Polymerisation gestartet. Zügig wird das Gel dann in die Gelkammer gegossen. Isopropanol wurde zum Glätten des Übergangs von Trenn- und

3. Methoden

Sammelgel benutzt und nach dem Ende der Vernetzungsreaktion (15 Minuten) restlos entfernt.

Komponente	Menge in μl
Wasser, doppelt destilliert	2600
Trenngelpuffer, 1,5M Tris-HCl, pH=8,8	1300
Acrylamid/Bisacrylamid, 30 %	1000
SDS, 10%	50
APS, 10%	50
TEMED	4

Tabelle 3.3 Zusammensetzung Trenngel, 6 %

Dann wird das Sammelgel hergestellt und in gleicher Weise in die Gelkammer überführt. Mit Hilfe eines 10 zahnigen Kammes werden die Taschen zur Proteinauftragung ausgespart.

Komponente	Menge in μl
Wasser, doppelt destilliert	1350
Sammelgelpuffer, 0,5M Tris-HCl, pH=6,8	250
Acrylamid/Bisacrylamid, 30 %	335
SDS, 10%	20
APS, 10%	20
TEMED	2

Tabelle 3.4 Zusammensetzung Sammelgel, 5 %

Nach weiteren 20 Minuten Polymerisationszeit wird das Gel aus der Kassette entfernt und in einen Elektrophoreserahmen eingespannt. 1 x Lämmli-Puffer wird zunächst in die innere Kammer des Rahmens gegeben. Erweist sich diese als dicht, wird der Rahmen in eine Wanne gesetzt. Innere Kammer und Wanne werden mit 1 x Lämmli-Puffer aufgefüllt. Der Kamm wird entfernt. Alle Taschen werden 2 x mit Puffer gespült.

Die Gele werden solange equilibriert, bis die Proben hergestellt sind (i.e. 30 Minuten). Die Elektrophorese wurde nach dem Auftragen der Proben für 2 Stunden mit einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 500 mA kontinuierlich durchgeführt. Um den Fortschritt der Trennung nachzuvollziehen, wurden in einer Spur 15 µl Prestained Protein-Marker mitgeführt. Dieses wurde mit den anderen Samples denaturiert.

3.9 Elektrophoretische Übertragung

Um die aufgetrennten Proteine mit Antikörpern nachzuweisen, werden sie elektrophoretisch vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wird für 15 Minuten in 1 x Blotting Puffer mit 25% Methanol equilibriert. In dieser Zeit wird Fließpapier (Whatman-Papers) und die Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten (i.e. 8,3 x 5 cm). Nachdem Whatman-Paper, Membran und Schwämme für 10 Minuten equilibriert wurden, wird die Transferrassette zusammengestellt. Auf die richtige Anordnung negative Elektrode – Gel – Membran – positive Elektrode muss geachtet werden.

Die Kassette wurde zusammengebaut und in eine Wanne eingesetzt. Die Wanne wurde vollständig mit 1 x Blotting Buffer mit 25 % Methanol gefüllt. Über Nacht wurde bei 4° C und einer Spannung von 25 V elektrophoretisch geblottet.

3.9 Immunodetektion

Nachdem die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt ist, will man das Protein detektieren. Dabei ist zu bedenken, dass Nitrozellulosemembranen Proteine unspezifisch binden. Weil die Antikörper zur Detektion Eiweiße sind und Interaktion zwischen Antikörper und Membran unerwünscht sind, muss die Membran geblockt werden, wofür die Membran für 1h bei Raumtemperatur in Magermilchpulver und PBS-Tween (PBS-T) geschwenkt wurde. Anschließend wurde kurz mit 0.1 %igem PBS-T gewaschen. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler LRRK₂-AB in einer Verdünnung von 1:1000 in einem Volumen von 1,5 ml eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten und erfolgte im Rotator. Danach wurde erneut in PBS-T gewaschen (3x 5 Minuten). Als Sekundärantikörper wurde ein mit Meerrettichperoxidase (hrp)-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper eingesetzt (Verdünnung 1:1000, Volumen 1,5 ml). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten und erfolgte im Rotator. Anschließend wurde erneut 3 x 5 Minuten in PBS-T gewaschen.

Die Darstellung der Antikörperverteilung erfolgte mithilfe des Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus Kits unter Beachtung der Bedienungsanleitung. Dazu wurde die Membran in einen Dunkelraum gebracht und Luminol sowie einem Oxidationsmittel ausgesetzt. Die Peroxidase katalysiert die oxidative Umwandlung des Luminols in ein Produkt, dessen Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm registriert werden kann. Zur Detektion wurde ein Kodak T-Mat Plus DG Röntgenfilm verwendet.

3.10 STATISTIK

Zur Übersichtsdarstellung univariater Daten wurden in dieser Arbeit Balkendiagramme (Barcharts) verwendet. Die Darstellung erfolgte durch Mittelwert \pm Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Als statistischer Test zum Vergleich zweier Datenreihen kam der ungepaarte, doppelte t-Test zum Einsatz. Die Meßskalen waren stetig und unimodal (z.B. ΔC_T -Wert). Für diese Arbeit wurde ein überzufälliger (=signifikanter) Unterschied zwischen den Beobachtungsgruppen bei einem $\alpha = 0,05$ festgelegt. Durch dieses Vorgehen wird ausschliesslich das Risiko für Fehler 1. Art α kontrolliert (falsch positive Ablehnung der Nullhypothese), nicht aber das Risiko für Fehler 2. Art β (falsch negative Nichtablehnung der Nullhypothese). Der t-Test wurde mit Hilfe des Microsoft Excel-Programms TTEST($x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1n}; x_{21}, x_{22}, \dots, x_{2n}; 2; 2$) berechnet. Zur Darstellung bivariater Merkmale wurden Punktdiagramme (Scattergramme) eingesetzt.

3.10 Zellzählung und Statistik

Um die Prozentzahl der Zellen zu quantifizieren, die mit GFP kotransfiziert waren, wurde nach jedem RNA-Interferenzexperiment die Anzahl der positiven Zellen in einer Kammer bestimmt und ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtzahl der Zellen in dieser Kammer. Durch Überlagerung des Gesamtlichts mit der Grünlichtfluoreszenz konnten Bilder erzeugt werden, in denen nicht-fluoreszierende Zellen und grün-fluoreszierende Zellen gleichzeitig sichtbar waren. Insgesamt wurden pro Experiment circa 500 Zellen ausgezählt (etwa 100 Zellen in 5 zufällig gewählten Bildausschnitten).

4 Ergebnisse

4.1 EIGENSCHAFTEN DER MN9D-ZELLEN

Die Zellen wurden adhärent auf 6-Well-Mikrotiterplatten kultiviert (siehe Abbildung 4.1). Im Schnitt mussten sie nach 60 Stunden gesplittet werden. MN9D-Zellen neigen dazu, in Verbänden kugelförmig zusammenzuwachsen (Abb. 4.1A). Unter Forskolin verlängerten sich die Ausläufer, sodass die Zellen morphologische Merkmale neuronaler Zellen annahmen (Abbildung 4.1). Die Rate toter, abgelöster Zellen wuchs unter Forskolin leicht an. Solche Zellen, die sich vom Boden der 6-Well-Mikrotiterplatte abgelöst hatten, wurden mit dem Medium entfernt. Waren mehr als 20% der Zellen abgestorben, wurde die gesamte Zellcharge verworfen. Die verbleibenden Zellen wurden mit PBS gespült, zur Ablösung trypsinisiert und den RNA-Interferenz-Experimenten zugeführt.

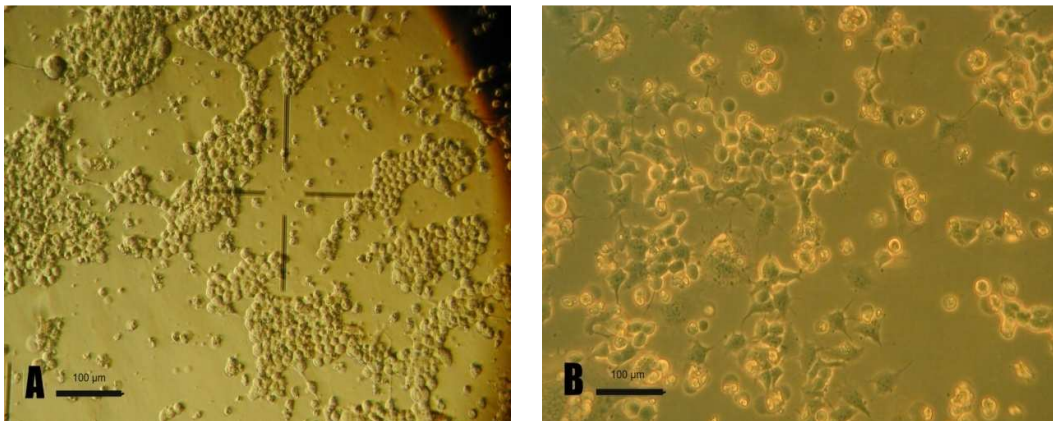


Abbildung 4.1 MN9D-Zellen im Kulturmedium, 10x: (A) Man erkennt deutlich die typisch kugelige Gestalt der Zellkörper ohne Fortsätze; (B) 48h nach Behandlung mit 100 µl Forskolin verlängern sich die Ausläufer.

4.2 BESTIMMUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ

Um die Transfektionsrate abzuschätzen, wurde neben der siRNA ein Vektor für das grüne, fluoreszierende Protein (GFP_{max}) kotransfiziert. Aus technischen Gründen zeigt Abbildung 4.2 ein mikroskopisches Bild, bei dem der Fluoreszenzanteil zu Ungunsten des Gesamtlichts überwiegt, sodass nicht-transfizierte Zellen im schwarzen Hintergrund

verborgen bleiben. Am Mikroskop konnte eine Einstellung gefunden werden, bei der auch nicht-transfizierte Zellen sichtbar waren. Die Anzahl grüner Zellen wurde durch diese Gesamtzahl der Zellen geteilt und so die Transfektionsrate bestimmt. Sie betrug experimentabhängig niemals weniger als 40% oder mehr als 60%. Der Mittelwert lag bei 52%. Nicht kotransfizierte Zellen zeigten kein Fluoreszenzsignal. Es gab keine Unterschiede im Fluoreszenzsignal zwischen 48h oder 72h nach Transfektion.

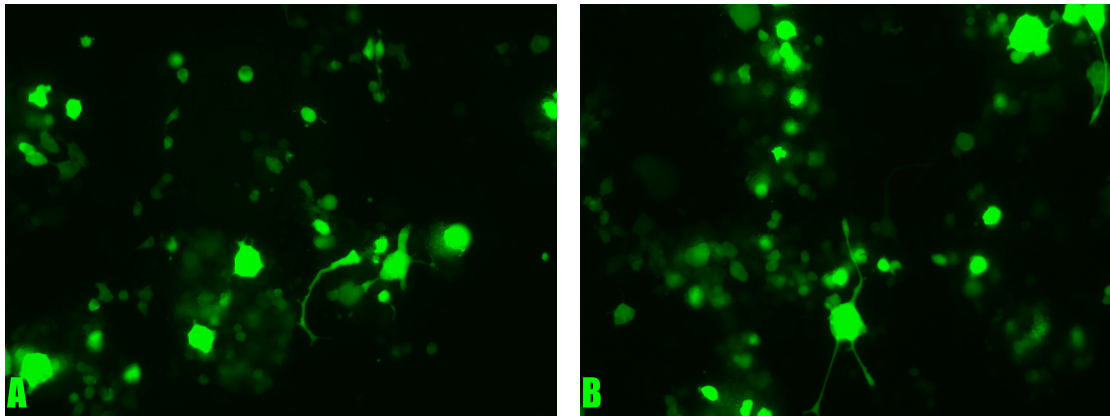


Abbildung 4.2 MN9D-Zellen nach der Transfektion mit 5 μ l siRNA und 2 μ l p_{max}GFP; (20x). Betrachtung in der Fluoreszenzmikroskopie bei 490nm: A: Kotransfizierte Zellen 48h nach Nukleofektion, B: Kotransfizierte Zellen 72h nach Nukleofektion

4.3 BESTIMMUNG DES LRRK2-KNOCKDOWNS AUF mRNA-EBENE

Nach der Transfektion wurde die Stärke des LRRK2-Knockdown auf mRNA-Ebene durch PCR bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach der Nukleofektion 48 bis 72h kultiviert, da erst dann mit dem Abbau von mRNA nach RNA-Interferenz zu rechnen war. Nach diesen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und mittels RT-PCR auf LRRK2-mRNA-Gehalt untersucht. Etwa 15-20% der Zellen waren zum Zeitpunkt der Ernte abgestorben und wurden entfernt. Die Menge der verbliebenen mRNA in „control“- und „ko“-Proben wurde getrennt gemessen und jeweils auf das Haushaltsgen Hydroxymethylbilansynthase (HMBS) normiert. LRRK2-mRNA wurde in allen untersuchten Zellen nachgewiesen. Es war allerdings ein wenig transkribiertes Gen. Der Schwellenwert (C_T), mit dessen Hilfe die Quantifizierung möglich ist, wurde meist erst

nach 30 PCR-Zyklen erreicht und in Extremfällen erst nach 34 Zyklen. Die Vervielfältigung des korrekten Amplikons wurde durch die Schmelztemperatur in der Dissoziationskurve kontrolliert, weil diese proportional zur Länge des vervielfältigten Amplikons ist. Sie betrug zwischen 73,2°C und 74,7° C. Variationen gab es nur zwischen Versuchswiederholungen, da die Länge des Amplikons in diesen wahrscheinlich etwas variierte. Kam es in den Negativkontrollen (No-Template-controls) zu C_T -Werten kleiner 35 wurden Unterschiede in den Dissoziationskurven genutzt, um Hintergrundsignal von echter Amplifikation (i.e. Verunreinigung) zu unterscheiden. Bei C_T -Werten größer 35 wurde der Versuch aufgrund zu niedriger initialer Kopienzahl als ungültig gewertet.

Abbildung 4.3 stellt die relative Expression von LRRK2 bezogen auf die „control“-Zellen dar. Nach 48h kam es zu einer Reduktion der Menge an LRRK2-mRNA um 53% gegenüber der Kontrollgruppe, nach 72h betrug die Reduktion 49% gegenüber der Kontrollgruppe.

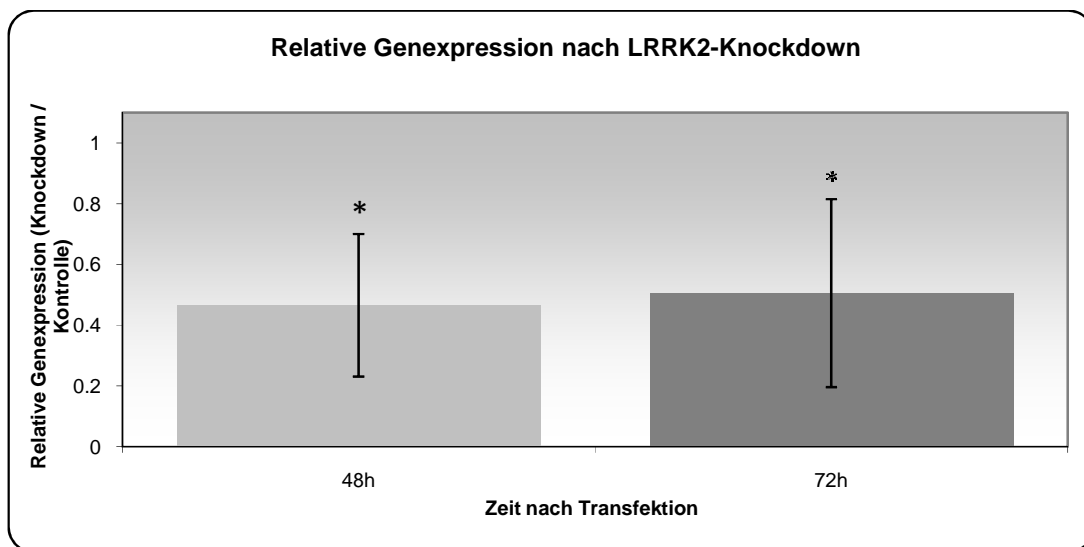


Abbildung 4.3 Relative Genexpression nach LRRK2-Knockdown. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler gezeigt. Mittelwert und Standardfehler beruhen auf 8 unabhängigen Experimenten. Der Stern zeigt Signifikanz mit $p < 0,05$ gegenüber Kontrollzellen

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der LRRK2-Knockdown nach 48h und 72h erfolgreich durch die synthetisierte siRNA mit einer Stärke von 50% herbeigeführt wurde, sodass für die anschließenden Experimenten von einer reduzierten LRRK2-mRNA-Aktivität ausgegangen werden kann.

4.4 BESTIMMUNG DES LRRK2-KNOCKDOWNS AUF PROTEIN-EBENE

Bei Experimenten mit RNA-Interferenz (RNAi) ist es wichtig, die Stärke des Knockdown sowohl auf *Transkriptions*- als auch auf *Proteinebene* zu charakterisieren. Die RNA-Interferenz eines stabilen Proteins könnte auf mRNA Ebene eine Reduktion zeigen, wohingegen der zelluläre Proteingehalt unverändert oder gar erhöht ist. Dies könnte durch kompensatorische Effekte wie verminderte Clearance geschehen. Aus diesem Grund wurden die Zellen wie bei den RNA-Experimenten kultiviert und auf ihren Proteingehalt mittels Western Blot untersucht. Es wurden gleiche Proteinmassen in die Elektrophoresetaschen aufgetragen, um Banden im Western Blot semiquantitativ beurteilen zu können. Als Molekulargewichtsleiter lief Invitrogens Magic Mark™ in einer Tasche. Zur Detektion des LRRK2 wurden die Proben nach der elektrophoretischen Auftrennung mit dem NB300-267-Antikörper der Firma Novus inkubiert und anschließend über einen Sekundärantikörper bzw. dessen Substratreaktion sichtbar gemacht.

Abbildung 4.4 zeigt Banden, die mit „KO“ für Knockdown-Zellen und „CONTROL“ für Kontroll-siRNA-Zellen für 48 Stunden Kultivierungszeit bezeichnet sind. Die dritte, mit „MN9D“ bezeichnete Bande zeigt den Blot für ein Proteinlysate unbehandelter MN9D-Zellen. Links neben dem Blot ist das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben, wie es durch den Molekulargewichtsmarker MagicMark™ dargestellt wurde.

Im Blot zeigten sich Banden bei einem Molekulargewicht von 230 kDa, wobei das Signal der „ko“-Proben weniger intensiv als das der dazugehörigen „Control“-Proben war. Der siRNA-Knockdown reduzierte den Proteingehalt nach 48h sogar unter die Nachweisgrenze. Die Bande ist in unbehandelten „MN9D“-Zellen am signalintensivsten. Obwohl das Signal nicht bei dem vorhergesagten Molekulargewicht von LRRK2 von 280 kDa liegt, ist dieses Resultat mit LRRK2 vereinbar, weil die Proteintrennung in der Gelelektrophorese nicht strikt nach Molekulargewicht erfolgt. Der Umstand wurde zudem in einer Arbeit von Biskup et al. mit dem gleichen Antikörper ebenfalls beobachtet [33].

Weitere starke Signale zeigten sich bei einem Molekulargewicht von 70 kDa und 130 kDa, wobei diese annähernd gleiche Signalstärke in den einzelnen Banden besaßen und also unbeeinflusst vom Knockdown waren. Sie entsprechen am ehesten unspezifischer Antikörperbindung.

4. Ergebnisse

Insgesamt zeigte der Western Blot, dass sich die Reduktion der *LRRK2-mRNA* auf den *LRRK2-Proteingehalt* der MN9D-Zellen auswirkte.

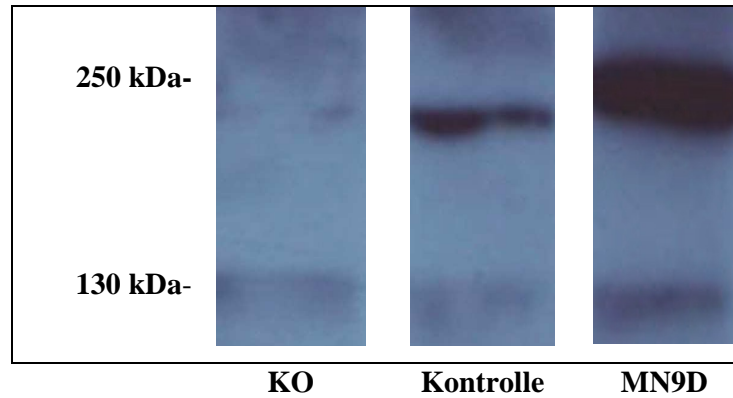


Abbildung 4.4 Western Blot von Proteinlysaten LRRK2-transfizierter („ko“) und nicht LRRK2-transfizierter („control“) MN9D-Zellen nach 48 Kultivierungszeit. Es wurde mit dem Novus NB300-267-Antikörper inkubiert. Die Spur „MN9D“ entspricht unbehandelten, nicht transfizierten Zellen.

4.5 BESTIMMUNG DER LEBENSFÄHIGKEIT DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN

Nachdem die Veränderung des LRRK2-Gehalts auf transkriptionaler sowie auf proteinärer Ebene beschrieben war, ging es darum, Veränderung zwischen der Kontroll- und der KO-Gruppe zu beschreiben.

Ziel der Messungen war es, den Einfluss des Knockdown auf die Proliferation der MN9D-Zellen zu untersuchen.

Dazu wurden globale Messungen der Proliferation in Form von MTT-Test und BrdU-Test durchgeführt (siehe Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6). Der MTT-Test misst die Proliferation indirekt, indem er die metabolische Aktivität der untersuchten Zellen widerspiegelt. Der BrdU-Test hingegen ist ein direktes Maß der DNA-Synthese, weil sich das Pyrimidinanalogon Bromdeoxyuracil während der Replikation in die DNA einbaut.

4.5 MTT-Test

Die transfizierten Zellen wurden nach der Nukleofektion mittels eines MTT-Tests auf ihre metabolische Aktivität untersucht. Beim MTT-Test wird gelbes Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid-Salz (MTT) in Abhängigkeit vom zellulären NADH₂-Gehalt zu lilafarbenem Formazan reduziert. Der Farbumschlag wird dann photometrisch quantifiziert.

Abbildung 4.5 zeigt die ermittelten Ergebnisse als absolute Absorptionswerte. Die Absorption entspricht der Menge des gebildeten Formazans und ist direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler.

Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zwischen transfizierten und unbehandelten, d.h. nicht transfizierten Zellen eine um 20 % reduzierte Proliferationsrate. Im Vergleich zwischen Knockdown- und Kontrollzellen existierten dagegen keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität, d.h. beiden Zellchargen standen annähernd gleiche Mengen Reduktionsäquivalente zur Verfügung.

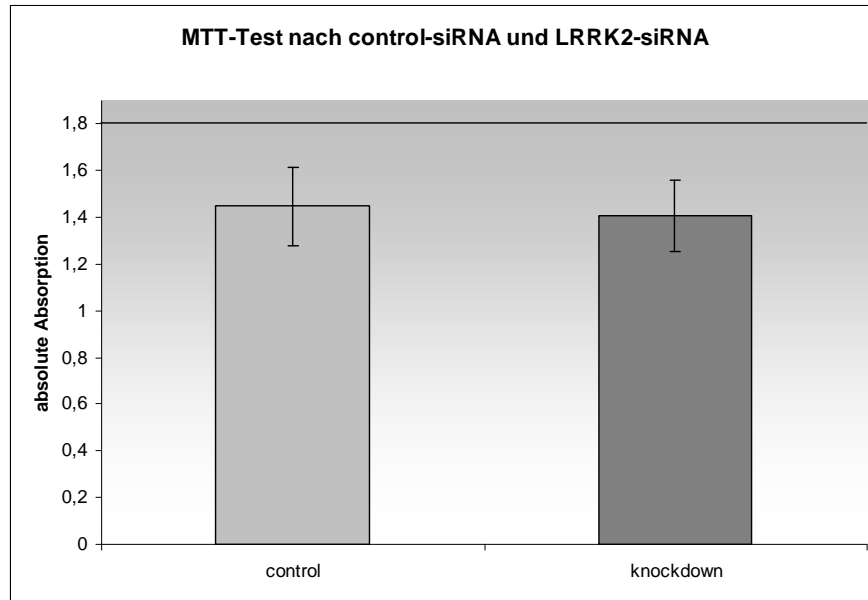


Abbildung 4.5 Mittelwerte der Absorption im MTT-Test bei einer Wellenlänge von 550nm nach 6 unabhängigen Versuchen mit Standardfehlern. Die Absorption in unbehandelten Zellen ist als horizontale Linie dargestellt.

4.5 BrdU-Test

Beim BrdU-Proliferations-ELISA wird Bromdeoxyuracil in die DNA sich teilender Zellen eingebaut, mit einem Antikörper markiert und über eine Substratreaktion quantifiziert. Er gilt als direkter Test für die Proliferation. Der Einbau des BrdU erfolgt hauptsächlich in Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Das sind in nicht synchronisierten Zellkulturen circa 30%. BrdU wird außerdem im Rahmen von DNA-Reparaturmechanismen in das Genom integriert, was in diesem Test allerdings vernachlässigt wurde.

Abbildung 4.6 gibt die absolute Absorption für mit control-siRNA und LRRK2-siRNA transfizierte Zellen an. Diese entsprechen der Inkorporation von BrdU und damit der Proliferation der Zellkultur. Es wurden 4 unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt, deren Resultate gemittelt und mit dem Standardfehler dargestellt. Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zwischen transfizierten und unbehandelten, d.h. nicht transfizierten Zellen eine Reduktion des BrdU-Einbaus um 40 - 50 %. Im Vergleich zwischen Kontroll- und Knockdown-Gruppe bestanden indes keine Unterschiede, d.h. beide Zellchargen besaßen ein annähernd gleichartiges Niveau an proliferierenden S-Phase-Zellen.

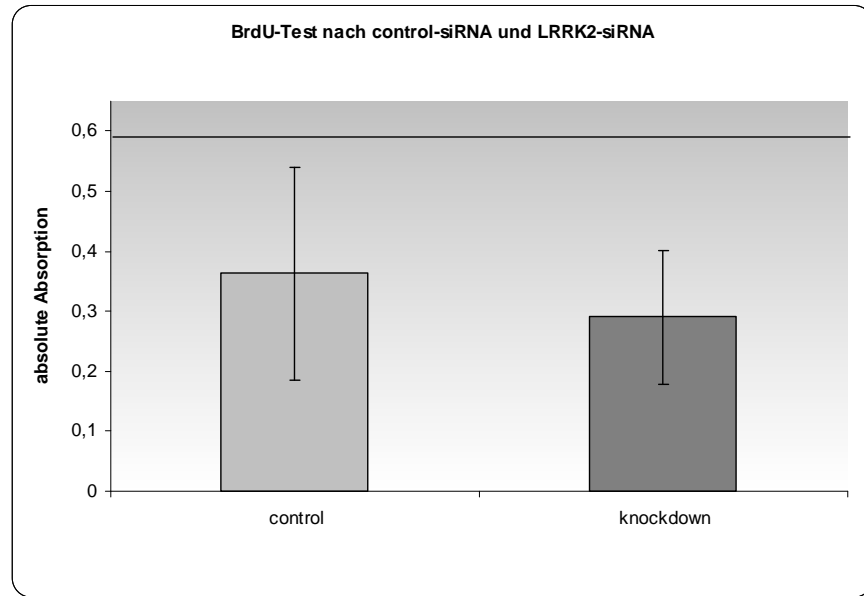


Abbildung 4.6 Mittelwert der Absorption im BrdU-Test bei einer Wellenlänge von 450 nm nach 4 unabhängigen Versuchen. Die gemessene Absorption bei unbehandelten Zellen ist als horizontale Linie dargestellt.

In der Zusammenschau beider Tests wurde ersichtlich, dass Unterschiede in der Proliferationsfähigkeit der MN9D-Zellen auf der Nukleofektion per se beruhen. Die Verringerung des LRRK2 in den Knockdown-Zellen besaß im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation der MN9D-Zellen.

4.6 AUSWIRKUNGEN DES KNOCKDOWNS VON LRRK2 AUF NEURALE MARKER

Neurale Marker wurden in diesem Versuch auf ihre transkriptionale Expressivität in der RT-PCR untersucht, um Auswirkungen des LRRK2-Knockdown auf die MN9D-Zellkultur zu charakterisieren. Für die Experimente standen Oligonukleotidprimer für Tyrosinhydroxylase (TH), β_3 -Tubulin und Nestin zur Verfügung.

TH katalysiert die Umwandlung von Tyrosin in Dihydroxyphenylalanin (DOPA), was der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Synthese von Dopamin und den Katecholaminen darstellt. TH findet sich in allen Dopamin- und Katecholamin-

produzierenden Zellen, wozu die MN9D-Zellen gehören [28]. β_3 -Tubulin ist Bestandteil des Zytoskeletts und ist ein früher Marker für neuronale Differenzierung. Nestin ist ein Intermediärfilament und wird überwiegend in ZNS-Vorläuferzellen exprimiert. Während der terminalen neuronalen und glialen Differenzierung wird Nestin zunehmend durch Zelltyp-spezifische Intermediärfilamente ersetzt, sodass sein Vorkommen als Hinweis auf undifferenzierte (Stamm)-Zellen gesehen wird.

Zum Einsatz kam dieselbe RNA, die in der quantitativen RT-PCR eine Verringerung des LRRK2-Gehaltes gezeigt hatte. Abbildung 4.7 zeigt die gemittelten Resultate für die Proteine Tyrosin-Hydroxylase (TH), β_3 -Tubulin und Nestin als relative Genexpression bezogen auf die Kontrollgruppe und Hydroxymethylbilansynthase (HMBS), sodass „1“ identischem mRNA-Gehalt in Kontroll- und KO-Gruppe entspricht. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler dargestellt. Die Daten zeigen, dass alle neuronalen Marker in der Knockdowngruppe stärker exprimiert wurden, als in der Kontroll-siRNA-Gruppe. Diese Beobachtung war statistisch allerdings nicht signifikant mit Ausnahme der Expression von Tyrosinhydroxylase nach 72h Kultivierungszeit. Man sagen kann, dass der LRRK2-Knockdown keine grundlegende Veränderung der neuronalen Eigenschaften der Zellkultur verursachte.

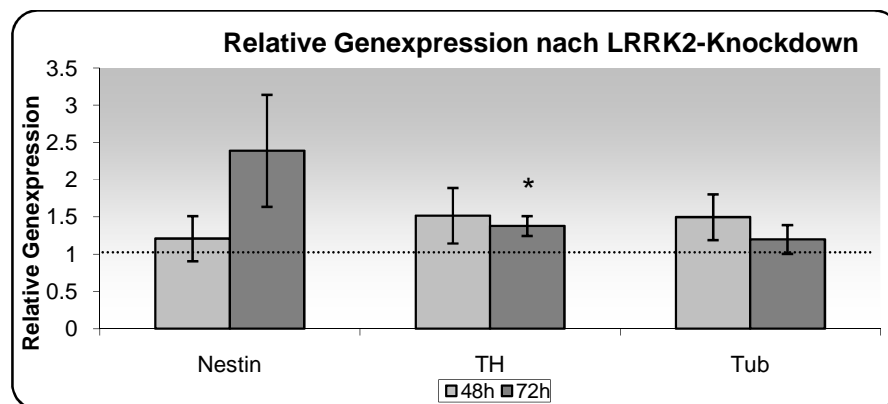


Abbildung 4.7 Relative Expression von neuronalen Markergenen nach LRRK2-Knockdown bezogen auf die Transfektion mit control-siRNA und Normierung auf HMBS als Mittelwert und Standardfehler ($n \geq 6$). 1 entspricht identischer Expression zwischen Knockdown- und Kontrollzellen. (* = $p < 0.05$ gegenüber Kontrollzellen)

4.7 AUSWIRKUNGEN DES LRRK2 KNOCKDOWNS AUF DEN ZELLZYKLUS

Eine Hypothese zum Pathomechanismus des LRRK2 besteht in der Aktivierung von Zellzyklusmechanismen, die konsekutiv, also „downstream“ zu neuronalem Tod führen [40]. Daher sollte in diesen Versuchen herausgefunden werden, ob durch den geringeren Gehalt an LRRK2-mRNA Veränderungen im Zellzyklus beschrieben werden können. Dazu wurde aus transfizierten Zellen RNA isoliert, diese in DNA umgeschrieben und Gene des Zellzyklus über die Polymerasekettenreaktion quantifiziert. Die mRNA der Kontroll- und der KO-Gruppe wurde gemessen, auf das Haushaltsgen HMBS normiert und miteinander verglichen. Es wurden mindestens 6 unabhängige Versuchswiederholungen durchgeführt. Abbildung 4.8 zeigt die ermittelten Resultate für die Gene CDKN1A, PCNA, RPA3 und CCND1, deren Genprodukte verschiedene Aufgaben im Zellzyklus spielen. Der Zellzyklus unterliegt einer molekularen Kontrolle, für die sich der Oberbegriff des Zellzykluskontrollsystems etabliert hat und der in allen Eukaryoten ähnlich abläuft. Zwei wesentliche Proteingruppen bilden den Kontrollmechanismus: Die Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) und die Zykline (CCN). Nur die Zykline unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Die CDKs liegen in konstanten Konzentrationen vor. Damit eine Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten kann, muss sie sogenannte Kontrollpunkte überwinden, was nur unter günstigen Bedingungen möglich ist. Das Signal eines überwundenen Kontrollpunkt wird durch Komplexierung der CDK und Zyklin erzeugt.

CDKN1A steht für cyclin-dependent kinase inhibitor 1A und wird synonym als „p21“ bezeichnet. Das Protein bindet und inhibiert u.a. die Zyklin-CDK-Komplexe 4 und -6. Es reguliert den Zellzyklus, indem es den Komplex sterisch (d.h. räumlich) deaktiviert [34]. Der spezifische Abbau durch CASP3-like-Caspasen wird als Hinweis auf eine Funktion bei der Exekution der Apoptose gewertet.

Das PCNA („proliferating cell nuclear antigen“) ist an DNA-Replikation, -Reparatur und dem Zellzykluskontrollsystem beteiligt [35]. Es wird vor Allem in Zellkernen exprimiert, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden [36]. Es handelt sich um eine DNA-Klammer, welche den Kontakt zwischen DNA und DNA-Polymerase δ unterhält. PCNA und CDKN1A interagieren miteinander, indem CDKN1A und die Polymerase δ um

Bindung am PCNA konkurrieren [35]. Es wird daher vermutet, dass das PNCA als Schalter zwischen DNA-Synthese und DNA-Reparatur wirkt. PNCA, RPA3 und andere Proteine sind außerdem an der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beteiligt [37].

Zyclin D1 (CCND1) fungiert als Regulator des Zellzyklus, indem es mit den gleichen CDKs komplexiert, die durch CDKN1A gehemmt werden (i.e. CDK-4 und CDK-6). Die Transition von G_0 in die G_1 -Phase wird durch diese Komplexbildung kontrolliert. Die Überaktivität von CCND1 führt über die Progression in die S-Phase des Zellzyklus zur Tumorgenese [40].

RPA3 bildet als Untereinheit eines Heterotrimer das Replikationsprotein A (RPA). Es ist in der Lage, einzelsträngige DNA zu binden und besitzt wichtige Funktionen im Zellzyklus und seinen Kontrollpunkten. Außerdem kommen dem RPA3 wichtige Funktionen bei der DNA-Replikation, -Reparation und -Rekombination zu. Hyperphosphoryliertes RPA fungiert als Stresssignal und verursacht Downstream-Veränderungen der RPA-Funktionen [37]. Als Kinasen werden Mitglieder der PIKK-Kinasefamilie diskutiert.

Abbildung 4.8 zeigt in Analogie zur Abbildung 4.7 die relative mRNA-Expression der untersuchten Proteine, die auf die mit control-siRNA behandelten Zellen normiert ist. Dem Wert „1“ entspricht daher die identische Expression zwischen Kontrolle und KO-Gruppe, was durch die horizontale Linie verdeutlicht wird. Wie schon bei den Daten der neuronalen Marker ist die Expression in der Knockdowngruppe im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. Diese Erhöhung war nur für PCNA statistisch signifikant, welches 48 Stunden nach der RNA-Interferenz auf das 2.1-fache erhöht gemessen war. Für die Gene CDKN1A, RPA3 und CCND1 konnte indes kein Einfluss des LRRK2-Knockdown auf das Expressionsmuster nachgewiesen werden.

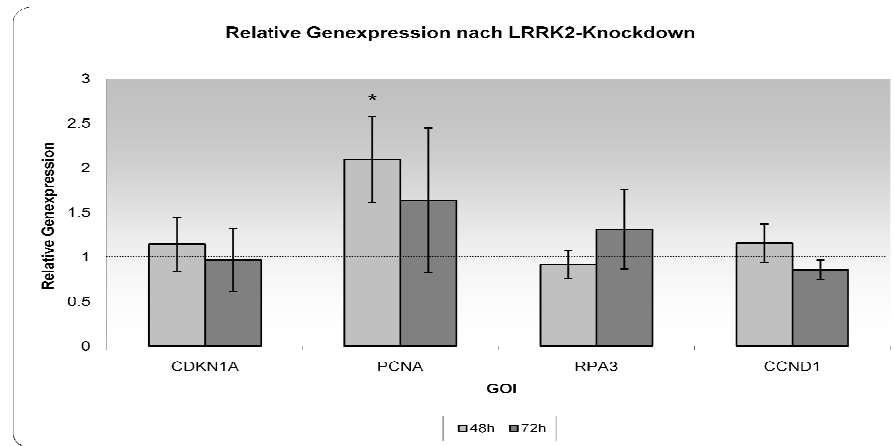


Abbildung 4.8 relative Expression von Genen des Zellzyklus nach LRRK2-Knockdown im Vergleich zur Transfektion mit control-siRNA nach 48h und 72h. Werte auf HMBS als Haushaltsgen normiert. „1“ entspricht identische Genexpression in „ko“- und „control“-Gruppe. Als Fehlerindikator ist der Standardfehler gezeigt. ($n \geq 6$) (* = $p < 0.05$)

Die gemittelten Werte für die Expression der neuronalen Marker beziehungsweise der Marker des Zellzyklus haben mit Ausnahme von Tyrosinhydroxylase und dem Kernantigen proliferierender Zellen (PCNA) keine LRRK2-spezifischen Effekte gezeigt. Daher stellte sich die Frage, ob unterschiedlich starke Reduktion von LRRK2 verschiedene zelluläre Reaktionen bei den MN9D-Zellen verursachten und diese durch die Bildung des Mittelwertes nicht offensichtlich wurden. In Abbildung 4.9 wurde die Genexpression *in Abhängigkeit* vom LRRK2-Knockdown graphisch als Funktion $y = f(x) = \text{GOI}(\text{LRRK2})$ dargestellt. Auf der Abszisse ist die *verbliebene* LRRK2-Expression angegeben, wie sie im Kapitel 4.3. dargestellt wurde. Zur Darstellung im Koordinatensystem kamen nur die Messwerte, bei denen eine LRRK2-Restaktivität kleiner 50% gegenüber der Kontrolle gemessen wurde.

Auf der Ordinate in Abbildung 4.9 ist die relative Expression der Gene β_3 -Tubulin und Tyrosinhydroxylase (TH) sowie PCNA und CDKN1A dargestellt. Die Relativität der Expression entstand durch die Normierung der KO-Werte auf die Kontrollwerte. Die x-Achse schneidet die y-Achse bei 1, was einer identischen Expression des Gens in „ko“- und „control“-Gruppe entsprach. Dieser Funktionswert teilt das Koordinatensystem in „oben“ und „unten“, d.h. in stärkere und schwächere Expression des Gens nach LRRK2-Knockdown.

4. Ergebnisse

Für Tubulin, TH und PCNA gilt, dass je kleiner der LRRK2-Wert, desto stärker wurden die Gene exprimiert. Daraus lässt sich ableiten, dass bei stärkerem Knockdown die Expression der Zielgene im Mittelwert gegenüber der Kontrolle deutlicher erhöht gewesen wäre und der Effekt der LRRK2-Defizienz also dosisabhängig ist.

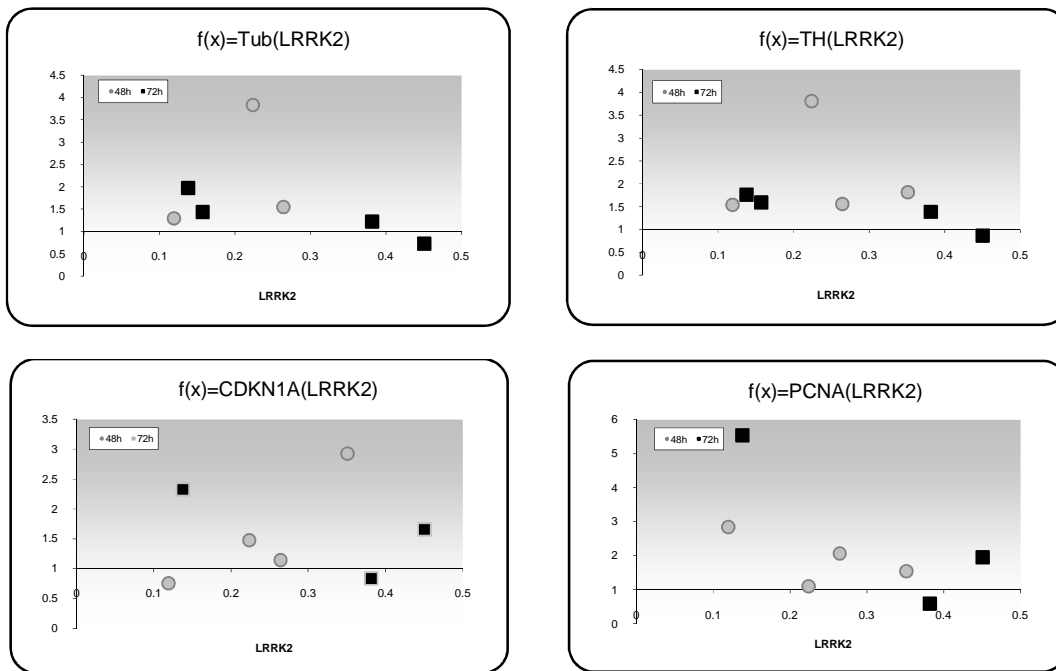


Abbildung 4.9 Die Genexpression ist auf der Ordinate über die LRRK2-Restaktivität auf der Abszisse aufgetragen. Der Schnittpunkt der x-Achse mit der Ordinate ist bei 1. „1“ entspricht identischer Genexpression von „ko“- und „control“-Gruppe und teilt das Diagramm in höhere Expression (oben) und niedrigere Expression (unten) nach LRRK2-Knockdown. Jeder Datenpunkt entspricht einem unabhängigen Experiment.

Bei CDKN1A war kein LRRK2-spezifischer Effekt erkennbar. Jedoch schien die relative Expression von CDKN1A und PCNA in ihrem Verhältnis zueinander durch den LRRK2-Knockdown beeinflusst. Die Abbildung 4.10 zeigt den Zusammenhang zwischen CDKN1A- und PCNA-Expression nach LRRK2-Knockdown. Jeder Datenpunkt im Diagramm hat seine Entsprechung in einem unabhängigen RNAi-Experiment. Die Achsen sind als relative Expression dargestellt, sodass Werten > 1 eine Zunahme der Expression nach LRRK2-Knockdown zuzuordnen ist. Werte, die 48h nach Knockdown erhoben wurden, sind als blaue Rechtecke, Werte nach 72h als rote Kreise dargestellt. Die Beziehung beider Proteine des Zellzyklus ändert sich im Zeitverlauf. Nach 48h gilt: ist die

CDKN1A-Expression durch LRRK2-Knockdown reduziert, wurde eine überhohe PCNA-Expression gemessen. Wurde CDKN1A durch den LRRK2-Knockdown vermehrt exprimiert, wurde weniger PCNA-mRNA nachgewiesen. Unter der Voraussetzung einer linearen Abhängigkeit, spiegelt sich diese indirekte Proportionalität in einem Bestimmtheitsmaß von 93% wider.

Nach 72h Stunden ist es aber genau umgekehrt. Wurde durch den Knockdown eine Reduktion der CDKN1A-Konzentration erzeugt, war auch PCNA erniedrigt. Erzeugte der Knockdown aber höhere Inhibitorkonzentrationen, war auch das PCNA erhöht.

Diese Daten sind hinsichtlich der Tatsache interessant, dass CDKN1A und PCNA direkt miteinander interagieren [35] und PCNA als Schalter zwischen DNA-Synthese und DNA-Reperatur beschrieben ist.

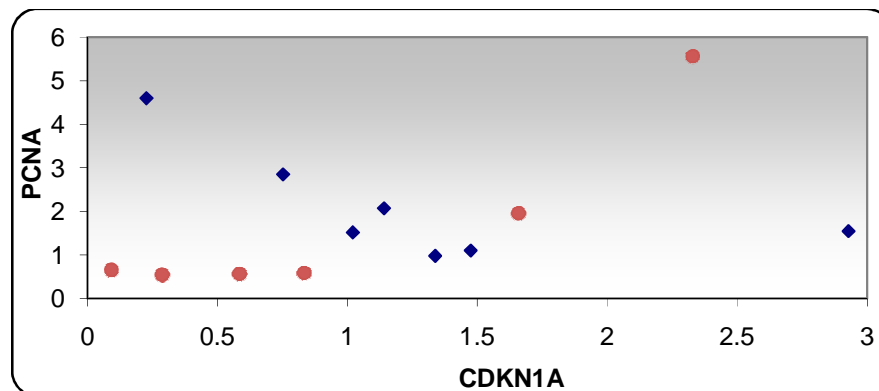


Abbildung 4.10 Graphische Darstellung der Beziehung von PCNA und CDKN1A nach 48h (blaue Rechtecke) und 72h Kultivierungszeit (rote Kreise). Skalierung als relative Expression nach LRRK2-Knockdown gegenüber Kontrollzellen.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass MN9D-Zellen TH- und LRRK2-positiv sind und LRRK2 in ihnen ein variabel transkribiertes Protein war. Der siRNA-Knockdown von LRRK2 wurde im Durchschnitt mit einer Stärke von 50%, einer Effizienz von ebenfalls 50% sowie einer Viabilität von 80% durchgeführt. Die posttranskriptionale Reduktion des LRRK2 war auch auf Proteinebene nachweisbar: im Western Blot lief das Protein mit der 230kDa-Bande und war in Knockdown-Zellen weniger signalintensiv als in Kontrollzellen. Die Zellen wurden durch die Manipulation ihres LRRK2-Gehaltes in ihrem Tyrosinhydroxylase-Gehalt verändert. Das Kernantigen proliferierender Zellen war erhöht,

was für eine Aktivierung des Zellzyklus der MN9D-Zellen spricht. Durch MTT- und BrdU-Test wurde gezeigt, dass durch die Transfektion von siRNA eine Reduktion der Metabolisierungsrate verursacht wurde, diese aber *nicht* LRRK2-abhängig war.

5 Diskussion

Das Protein *Leucine rich repeat kinase 2* (LRRK2) wurde vor wenigen Jahren mit dem Auftreten autosomal-dominantem Parkinsonismus in Verbindung gebracht. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von LRRK2 zu untersuchen, weil der Phänotyp der LRRK2-assoziierten Erkrankung nicht vom Idiopathischem Parkinsonsyndrom (IPS) zu unterscheiden ist und LRRK2 somit als therapeutischer Angriffspunkt Erfolge verspricht.

Hierzu wurde durch RNA-Interferenz das LRRK2 in murinen dopaminergen MN9D-Zellen herunter reguliert. Nachdem die Effizienz des Knockdown charakterisiert und die Proliferation der Zellkultur im MTT- und BrdU-Test beschrieben wurde, wurden die Expression neuraler Marker und Marker des Zellzyklus in der Polymerasekettenreaktion untersucht.

Das Nucleofector Device II der Firma Amaxa bietet verschiedene Programme zur Durchführung der Nukleofektion, bei denen im Wesentlichen Dauer und Stärke des elektrischen Feldes zur Elektroporation definiert werden. Amaxa spricht Empfehlungen zur Programmwahl zelltypspezifisch aus. Zum Zeitpunkt des Experiments war keine Empfehlung für MN9D-Zellen verfügbar. Daher wurde das verwendete Program A-020 empirisch als das Beste ermittelt. Die Transfektionsrate und -effizienz von 50% sowie circa 20% postexperimentell toter Zellen stellten den besten Kompromiss im Vergleich mit anderen Programmen dar, auch wenn in diesen isoliert höhere Werte für Zellüberleben oder Transfektionseffizienz zu verzeichnen waren. Inzwischen existieren MN9D-spezifische Daten von Weng et al., die eine deutlich höhere Transfektionseffizienz von 80% messen und daher die Verwendung eines anderen Programms (i.e. D-023) suggerieren [38].

Mit der *small interfering RNA* (siRNA) wurde der Vektor GFP_{max} kotransfiziert, um den Anteil transfizierter Zellen an der Gesamtzellzahl abzuschätzen. Eine Transfektionsrate von 50% entsprach den Erfahrungswerten aus der Literatur sowie der Kollegen im Labor [39]. Bei dieser Vorgehensweise sind wenig falsch-positive Testergebnisse zu erwarten, weil das GFP-Plasmid ein deutlich größeres Molekulargewicht als die siRNA besitzt und man davon ausgehen kann, dass alle GFP-transfizierten Zellen auch siRNA-transfiziert sind (hohe Spezifität). Die Anzahl falsch-negativer Zellen indes dürfte aus dem gleichen

Grund höher liegen (geringe Sensibilität). Daher ist die Angabe der Transfektionsrate über die Kotransfektion von GFP_{max} mit 52 % eher zu vorsichtig.

Nach 48h und 72h waren nicht alle Zellen adhärent auf der 6-Well-Mikrotiterplatte angewachsen. Wie oben beschrieben, hatte ein Anteil von circa 15-20% der Zellen das Experiment nicht überlebt. Weil der Anteil an grün leuchtenden Zellen an der Gesamtzahl toter, abgelöster Zellen größer als die Transfektionsrate von etwa 50% war, musste davon ausgegangen werden, dass die Nukleofektion per se den Zellen schadet. Bei dieser wird die Integrität der Zellmembran durch ein elektrisches Feld temporär aufgehoben (Porenbildung), damit kleine Moleküle von extra- nach intrazellulär transferiert werden können. Kommt es nicht zum spontanen Verschluss dieser Poren, kann das intrazelluläre Milieu nicht aufrecht gehalten werden und es kommt zum beobachteten Zelltod. Die abgestorbenen Zellen wurden entfernt, sodass die anschließenden Experimente ausschließlich mit den Zellen durchgeführt wurden, die weiter adhärent wuchsen, d.h. bei denen es zum spontanen Verschluss der Plasmamembran kam. Welche Aussagen können über diese weiterverwandten Zellen getroffen werden? Zum einen muss von einer Verzerrung durch Positivauslese (Selection Bias) ausgegangen werden, weil nur Zellen mit bestimmten Eigenschaften (hier: spontaner Verschluss der Zellmembran nach Elektroporation) weiter untersucht wurden. Zum anderen wurden die verbliebenen Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität nach der Nukleofektion charakterisiert. Sowohl im MTT- als auch im BrdU-Test wurde dabei eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit um 20% bzw. um 50% gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt. Die Elektroporation übt folglich auf die Zellen einen Stress aus, den sie durch Reparaturvorgänge überwinden muss. Dass es sich bei der Beobachtung um das Phänomen des Translationsshutdown handelt, ist insofern unwahrscheinlich, als dass die Länge der siRNA mit 21 nt bewusst unterhalb der Länge gewählt wurde, die als Auslöser für den Translationsshutdown beschrieben ist (i.e. 30+ nt) [26].

Insgesamt wird bei diesen Überlegungen deutlich, dass der experimentelle Aufbau Unzulänglichkeiten bei der Imitation der Vorgänge in vivo aufweist. Daher war der Bezug der für „ko“-Zellen ermittelten Werte auf unbehandelte MN9D-Zellen aufgrund dieser Ergebnisse unzulässig. Erst durch den Bezug des Knockdown auf Zellen, die ebenfalls nukleofiziert wurden, erreicht man eine zulässige Vergleichsgrundlage, weil für beide

Zellchargen „ko“ und „control“ die gleichen Stressoren durch die Nukleofektion bestanden.

Außerdem zeigt die Tatsache, dass die Proliferation bei „ko“ und „control“-Zellen gleich war, dass der Abbau von LRRK2-mRNA sowie deren proteinäre Reduktion in MN9D-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation im Sinne des BrdU-Einbaus beziehungsweise des Reduktionspotentials besitzt.

Durch die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion war es möglich, initiale Kopienzahlen eines mRNA-Transkripts zum Zeitpunkt t zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass LRRK2 in MN9D-Zellen ein wenig und variabel transkribiertes Gen war. Normierte man die Ct-Werte auf das *House-keeping-Gene* Hydroxymethylbilansynthase (HMBS), wurden große Unterschiede in der Expression des LRRK2 ersichtlich. MN9D-Zellen aus verschiedenen Zellkulturflaschen unterscheiden sich in ihrer LRRK2-Expression um bis zu einem Faktor Tausend. Es muss folglich Faktoren geben, die die Zellen anregen, mehr oder weniger LRRK2 zu bilden. Weil diese Unterschiede stets „ko“- und „control“-Gruppe in gleichem Maße betrafen, müssen diese Faktoren zeitlich vor dem Nukleofektionsexperiment liegen. Leider ist es in der Zeit der Versuchsdurchführungen nicht gelungen, diese Faktoren zu isolieren beziehungsweise zu eliminieren. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist die Unterschiedlichkeit in der Zusammensetzung der Zellkultur mit der Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Nukleofektion die Zellen asynchron, d.h. in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus waren, in welchen LRRK2 möglicherweise auf unterschiedlicher Weise exprimiert wird. Letztlich verkompliziert diese Tatsache die Zusammenfassung von Daten aus verschiedenen Versuchsdurchführungen, weil solche „unkontrollierbaren Schwankungen“ großen Einfluss auf die molekularen Auswirkungen eines LRRK2-Knockdowns besitzen könnten. Es bleibt fraglich, ob Zellen ähnlichen Schwankungen im Expressionsmuster des Dardarin auch *in vivo* ausgesetzt sind oder ob es sich um reine *in vitro*-Effekte handelt.

Bei dem Versuch, die Effektivität des Knockdowns im Western Blot auch auf Proteinebene zu charakterisieren, verursachten die Größe sowie die generell geringe Expression des LRRK2 in MN9D-Zellen praktische Schwierigkeiten: Die signalstarken Banden fanden sich nur in der Nähe der vorhergesagten Größe des LRRK2.

Handelt es sich bei diesen Banden überhaupt um LRRK2? Das vorhergesagte Molekulargewicht von LRRK2 ist zwar 280kDa, der Nachweis bei 240kDa wurde jedoch beschrieben [33] und kann mit unterschiedlichen Wanderungseigenschaften der Markerproteine gegenüber LRRK2 erklärt werden. Die Vorstellung, dass in der Gelelektrophorese die Auftrennung der Eiweiße nach Molekulargewicht geschieht, kommt von der Maskierung der Eigenladung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS), die eine konstante Ladung pro Längeneinheit Eiweiß erzeugen soll. Die Wanderungseigenschaft der Proteine wird so als lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts beschrieben, d.h. als unabhängig von der Nettoladung. Es ist aber denkbar, dass der kommerzielle Molekulargewichtsmarker andere Ladungseigenschaften mitbringt, als die manuell mit SDS versetzten Proteinproben des Experiments und sich so die Unterschiede in der Beweglichkeit im elektrischen Feld erklären. Schließlich ist es auch nicht ausgeschlossen, dass das vorhergesagte Molekulargewicht des LRRK2 mit 280kDa zu hoch ist.

Weil die unbehandelten Zellen das stärkste Signal aufwiesen und die Kontrollzellen ein stärkeres als die Knockdownzellen, darf davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten Banden um LRRK2 handelt. Dieses Ergebnis lässt sich unter verschiedenen Gesichtspunkten interpretieren: unter der Voraussetzung, dass der Antikörper spezifisch für LRRK2 ist, ist dieses Ergebnis Ausdruck des Erfolgs des Knockdown. Unter der Annahme, dass mRNA-Reduktion beim LRRK2 auch proteinäre Reduktion verursacht, argumentiert man für die Sensitivität des Novus-Antikörpers für LRRK2.

Die Tatsache, dass 48h nach Knockdown LRRK2 nicht nachweisbar ist, lässt Rückschlüsse auf den Metabolismus des Proteins zu. Offenbar ist das Aufrechterhalten der LRRK2-Konzentration nach 48h auf Neusynthese (Translation) angewiesen, weil ja RNA-Interferenz einer posttranskriptionaler Hemmung entspricht. Die LRRK2-Halbwertszeit dürfte entsprechend geringer als 24 Stunden sein.

Nachdem der Knockdown charakterisiert worden war, ging es in dieser Arbeit darum, Unterschiede zwischen den Knockdown- und Kontrollzellen zu objektivieren. Dazu wurden Expressionsmuster von neuronalen Markern und Genen des Zellzyklus in der PCR untersucht. Bei allen untersuchten Markern konnte in der LRRK2-defizienten Gruppe eine Erhöhung der Expression gemessen werden. Nur für Tyrosinhydroxylase (TH) und das

Kernantigen proliferierender Zellen (PCNA) war dieser Anstieg statistisch signifikant. Weniger LRRK2 verursachte in den MN9D-Zellen eine Erhöhung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität. Der vorhergesagte Pathomechanismus für LRRK2-Mutationen bei der Parkinsonkrankheit ist eine Überaktivität des Enzyms („Gain of Function“). Der RNAi-abhängige Knockdown entspricht also durch Reduktion der LRRK2-Aktivität dem Gegenteil der Zustände, wie sie bei LRRK2-Mutationen in vivo wahrscheinlich auftreten (Loss of function). Folgt aus dem LRRK2-Knockdown also eine Erhöhung der TH-Aktivität, könnte man postulieren, dass „Gain-of-Function“ des LRRK2 einer Reduktion der TH-Aktivität entspräche. Die TH-Erhöhung ist somit gut mit dem vorhergesagten Schädigungsmechanismus vereinbar, weil der Umkehrschluss mit spezifischer Neurotoxizität dopaminerger Neurone vereinbar ist. Die Daten legen nahe, dass LRRK2 spezifische Effekte auf dopaminerge Neurone ausübt.

Anders steht es um die Erhöhung von PCNA durch den LRRK2-Knockdown. Hintergrund der Versuche zur Funktion des Zellzyklus waren die Experimente von Höglinger et al., die spezifische dopaminerge Neurotoxizität durch Überaktivierung des Zellzyklus mit anschließender Apoptose nachwiesen [40]. Die Hypothese war, dass mutiertes LRRK2 eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt, die zu einer Zellzyklusüberaktivierung führt. Die Hoffnung bestand darin, dass auch bei einer experimentellen Reduktion des LRRK2 Effekte auf den Zellzyklus zu verzeichnen wären. Die statistisch signifikante *Erhöhung* von PCNA ist hierzu allerdings widersprüchlich: wenn die LRRK2-Überfunktion den Zellzyklus aktiviert, sollte ein Knockdown von LRRK2 eine Reduktion oder mindestens keine Veränderung in der Proliferation bewirken. Hierzu ist zu sagen, dass die Messwerte nicht als eine markierte Aktivierung des Zellzyklus interpretiert werden können. Zum einen ist die Erhöhung nach 72h Kultivierungszeit nicht mehr signifikant gegen die Kontrolle erhöht. Zum anderen wurde Zyklin D₁ als Marker für die Progression von der G₀- in die G₁-Phase nicht als erhöht gemessen, insbesondere nicht in Korrelation zur Stärke des Knockdown. Insgesamt bringen diese Daten daher auch hinsichtlich der globalen Proliferationstests (MTT und BrdU) keinen sicheren Hinweis auf eine Überaktivität mit der Regulation des Zellzyklus und stehen daher nicht im Widerspruch zur Hypothese der LRRK2-abhängigen Zellzyklus-Überaktivierung.

Die graphische Darstellung vom PCNA und CDKN1A als Funktion der verbliebenen LRRK2-Aktivität erbrachte einige weitere, interessante Aspekte. Es ist tendenziell zu erkennen, dass die Stärke des Knockdown und die Expression von CDKN1A und PCNA miteinander korrelieren. Trägt man die Funktionswerte beider Proteine als Funktion $f = \text{CDKN1A (PCNA)}$ in ein Koordinatensystem, erhält man einen guten Zusammenhang, der unter der Annahme von Linearität mit einem Bestimmtheitsmaß von 93% beziehungsweise 80% beschrieben werden kann. Besonders interessant ist das, weil die DNA-Polymerase δ und CDKN1A um Bindung mit PCNA konkurrieren und so zwischen DNA-Replikation und DNA-Reparatur vermitteln [35]. Bindung der Polymerase δ führt zur Replikation, Bindung des CDKN1A zur Reparatur. 48 Stunden nach LRRK2-Knockdown entsprechen hohen Inhibitorkonzentrationen niedrige Messwerte für PCNA. Vermutlich würde der Inhibitorüberschuß in dieser Konstellation die Progression im Zellzyklus verhindern. Für 72 Stunden ergibt sich für kleiner werdende LRRK2-Aktivität ein Anstieg der PCNA-Expression mit erniedrigten CDKN1A-Werten. Effektiv dürfte diese Konstellation durch den relativen Mangel an Inhibitor den Eintritt in die S-Phase begünstigen. Die Tatsache, dass es einen markanten Wechsel in der Beziehung von PCNA und CDKN1A zwischen 48 und 72 Stunden Kultivierungszeit gibt, könnte Anlass zu weiteren Experimenten geben, weil es einen spezifischen LRRK2-Effekt auf den Zellzyklus und die Regulation der DNA-Synthese suggeriert.

Bei allen anderen neuronalen Markern war die Nullhypothese nicht zu widerlegen, die beobachteten Unterschiede im Mittelwert zufällig: die experimentelle Reduktion der LRRK2-Expression hatte keine Veränderungen in diesen neuralen Markern verursacht. Die Eigenschaften der MN9D-Zellen als homogene, dopaminerg-differenzierte Zelllinie mögen hierfür als Erklärung dienen. Nestin als Marker für Neurogenese aus polypotenten Stammzellen wurde in einer solchen Zellpopulation nicht reinduziert, wohl weil es keine solche Stammzellen mit Differenzierungspotential gibt. Ähnliche Überlegungen gelten für β_3 -Tubulin, das als Protein des Zytoskeletts bei der neurogenen Differenzierung erhöht ist. Die neurogene Differenzierung der MN9D-Zellen war durch Forskolin 48 Stunden vor den RNA-Interferenz-Experimenten erfolgt, sodass der LRRK2-Knockdown keine Effekte auf β_3 -Tubulin hatte. *In vivo*, hingegen, können durch diese Experimente weder Nestin noch β_3 -Tubulin als Kandidaten für Interaktion mit LRRK2 ausgeschlossen werden.

Die ermittelten Daten für die anderen Marker des Zellzyklus (CDKN1A, RPA3 und Cyclin D₁) zeigten keine Veränderungen der Zellzyklusproteine und bestätigen so die Resultate der Proliferationstests. Das Replikationsprotein wird nicht über die Genexpression reguliert, sondern über Hyperphosphorylierung, sodass eine markierte Veränderung der Konzentration durch den Knockdown nicht zu erwarten gewesen war. Es ist aber denkbar, dass LRRK2 durch seine Kinaseaktivität auf das RPA3 durch Phosphorylierung wirkt. Ein solcher Mechanismus wäre durch die Versuche allerdings nicht messbar gewesen.

In dieser Arbeit ist es gelungen, die RNA-Interferenz als Technik zum Genknockdown mit befriedigenden Parametern (Lebensfähigkeit, Stärke, Effizienz) durchzuführen. Die Resultate im Western Blot zeigten, dass die posttranskriptionelle Hemmung des Dardarin in den MN9D-Zellen Auswirkungen auf die Proteinmenge von Dardarin hat. Es existieren also keine kompensatorischen Mechanismen zur Aufrechterhaltung exakter Konzentration von Dardarin. In den Proliferationstests (BrdU, MTT) kam heraus, dass LRRK2-defiziente Zellen nicht auf unbehandelte MN9D-Zellen zu normieren waren, sondern auf eine mit control-siRNA behandelte Zellpopulation. Diese Normierung zeigte aber weder makroskopische noch mikroskopische Veränderungen der MN9D-Zellen. Auf mRNA-Ebene konnte eine Erhöhung der Tyrosinhydroxylase-Aktivität festgestellt werden, sodass die dopaminergen Eigenschaften der Neurone durch den Knockdown verändert wurden und eine spezifische Interaktion von LRRK2 mit dem dopaminergen Metabolismus in MN9D-Zellen suggerieren. Es wurde eine Erhöhung des PCNA gemessen, die aber im Kontext der Messwerte der anderen Zellzyklusgene sowie der Proliferationstests (BrdU und MTT) keine Effekte des Knockdowns auf den Zellzyklus der MN9D-Zellen darstellen. Die LRRK2-abhängige Beziehung des CDKN1A und PCNA suggeriert, dass LRRK2 dennoch einen spezifischen Effekt auf die Regulation des Zellzyklus ausübt,

6 Ausblick

LRRK2 ist ein besonderes Protein. Die besondere Stellung spiegelt sich in seinem Molekulargewicht oder dem Vorhandensein zweier Enzyme wieder. Seine Assoziation mit Parkinsonsyndromen sowie die Ähnlichkeit der Klinik mit dem Idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS) machen es auch in Zukunft zu einem interessanten, aber auch komplizierten Forschungsobjekt.

Der Ausblick auf weiterführende Experimente muss sich auf die Entschlüsselung der biologischen Rolle des Dardarin konzentrieren. Dazu gehört, die enzymatische Aktivität der beiden LRRK2-Enzyme zueinander und im Kontext des neuronalen Metabolismus zu definieren. Von diesen Erkenntnissen wird es abhängen, Schädigungsmechanismen bei Mutationen zu erkennen und therapeutische Methoden zur gezielten Intervention zu entwickeln.

Ein Grundwerkzeug zur Entschlüsselung der biologischen Funktion von Eiweißen sind verlässliche Antikörper im Modellsystem. Der Novus-Antikörper, der in dieser Arbeit benutzt wurde, stellt wohl den besten Marker für murines LRRK2-Protein dar, obwohl er in den durchgeführten Versuchen unspezifische Banden angefärbt hat. Daher besitzt die Charakterisierung anderer verfügbarer Antikörper hohen Stellenwert, insbesondere den vom neurologischen Labor der Universitätsklinik Dresden vorgelegten „in-house“-Antikörper. Nachdem die Güte des Knockdown durch diese Arbeit bestätigt wurde, könnte man zur Charakterisierung eines Antikörpers die Zellen nach LRRK2-Knockdown immunhistochemisch mit den Anti-LRRK2-Antikörpern anfärben und in der Fluoreszenzmikroskopie überprüfen, ob weniger LRRK2-Signal in der Knockdowngruppe vorhanden ist. Daneben besteht der vielleicht zuverlässigste Beweis für das Funktionieren eines Antikörpers im Western Blot in der Massenspektrometrie. Hierzu könnte man eine Auswahl verdächtiger Proteingrößen (i.e. 280 kDa, 240 kDa, 130 kDa, 72 kDa) nach Gelelektrophorese und Coomassiefärbung des Polyacrylamidgels ausschneiden und analysieren.

Mit hinreichend charakterisierten Antikörpern könnte man die zelluläre Verteilung des LRRK2 näher bestimmen, da es keineswegs sicher ist, dass der Pathomechanismus der LRRK2-Mutationen von dopaminergen Neuronen ausgeht. Andere neurale Zellen (Gliazellen oder striatale Neurone) könnten durch LRRK2-Malfunktion indirekte

dopaminerge Neurotoxizität verursachen. Hierfür könnte man ein konfokales Mikroskop einsetzen, welches dem neurologischen Labor zur Verfügung steht, um die genaue 3-dimensionale Distribution des LRRK2 zu bestimmen.

Um die Funktion des LRRK2 weiter beschreiben zu können, wäre die Immunfluoreszenzmikroskopie in Kombination mit guten Antikörpern eine geeignete Methode, um LRRK2 unter Vergiftung mit Agenzien zu beurteilen, die Parkinsonsyndrome auslösen (z.B. Rotenon, 6-Hydroxydopamin oder MPTP⁺).

Schließlich sollten den Hinweisen, die durch die vorgelegte Arbeit auf eine LRRK2-abhängige Interaktion von PCNA und CDKN1A als „molekularem Schalter“ zwischen Synthese und Reparatur gegeben werden, nachgegangen werden. Ein erster Schritt könnte darin bestehen, anstelle siRNA sogenannte Short-Hairpin-RNA (shRNA) einzusetzen, um einen stabilen Knockdown der MN9D-Zellen zu erzeugen. Der Vorteil bestünde darin, dass die LRRK2-Defizienz dann an Tochterzellen weitergegeben werden würde und durch Selektionsdruck transfizierte Zellen in Monokultur kultiviert werden könnten. Dann wären die Effekte des Knockdown leichter messbar und man könnte durch andere Experimente den Zellzyklus weiter charakterisieren. Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen nach ihrer DNA-Dichte sortiert werden, sodass S-Phase-Zellen quantifiziert werden können. Die Inkorporation von BrdU in Zellen nach LRRK2-Knockdown könnte immunhistochemisch nachgewiesen werden und die Zellen dann in der Fluoreszenzmikroskopie beurteilt werden. Dies hätte den Vorteil im Vergleich zum in dieser Arbeit durchgeführten Test, dass die BrdU-positiven Zellen mit den GFP-positiven Zellen überlagert werden könnten, sodass man dem wirklichen Effekt des Knockdown deutlich näher käme als durch die globale Messung dieser Arbeit.

In dieser medizinischen Doktorarbeit wurde die Zellproliferation im MTT- und BrdU-Test gemessen. Neben der Proliferation wäre es sinnvoll gewesen, die Apoptose zu messen. Hierzu würden sich Caspase-Aktivitäts-Assays oder TUNEL-Färbungen eignen.

Neben der experimentellen Unterexpression, besteht in der Überexpression von zellulärem LRRK2 eine weitere, wichtige Möglichkeit, um dessen Funktion zu verstehen. Dies ist hinsichtlich des vorhergesagten Pathomechanismus des LRRK2 durch Überfunktion besonders interessant. Zur Überexpression eines Genes, müssen Kopien des LRRK2-Gens in den Intrazellularraum gebracht werden. Als Vektor wären Plasmide oder (adeno)virale Systeme denkbar, die in großer Stückzahl vorliegen müssen. Die Vervielfältigung könnte

in Bakterien geschehen. Anschliessend könnten die Zielzellen durch Elektroporation mit den Vektoren transfiziert werden. In Analogie zu den durchgeführten Experimenten müsste zur Charakterisierung der Überexpression das Maß an Genaktivität gemessen werden. Die gelernten Methoden der Realtime-PCR sowie des Western Blot könnten hierfür erneut zum Einsatz kommen. Es wäre zudem denkbar, den Vektor mit einem Protein zu koppeln, für den zuverlässige Antikörper zur Verfügung stehen (z.B. GFP). Die auf diese Weise entstehenden Zellen könnte man hinsichtlich ihrer neuralen und proliferativen Eigenschaften untersuchen, wie dies in dieser Arbeit für die LRRK2-Defizienz durchgeführt wurde.

7 Thesen

1. MN9D-Zellen eignen sich als zelluläres Modell für die Pathogenese des Idiopathischen Parkinsonsyndroms.
2. MN9D-Zellen nehmen durch Forskolin morphologische und elektrophysiologische Eigenschaften von dopaminergen Neuronen an
3. MN9D-Zellen exprimieren LRRK2
4. LRRK2 ist am Pathomechanismus des Idiopathischen Parkinsonsyndroms beteiligt
5. Nukleofektion mit small interfering RNA führt zur exogenen Aktivierung der RNAi-Maschinerie.
6. Nach der Nukleofektion mit LRRK2-siRNA steht den MN9D-Zellen weniger LRRK2-Transkript zur Verfügung
7. Nach der Nukleofektion mit LRRK2-siRNA steht den MN9D-Zellen weniger LRRK2-Protein zur Verfügung
8. Der murine anti-LRRK2-Primärantikörper der Firma Novus ist spezifisch für LRRK2.
9. Reduktion des LRRK2 führt zu vermehrter Expression von Tyrosinhydroxylase in MN9D-Zellen
10. Reduktion des LRRK2 führt zu vermehrter Expression des Kernantigens proliferierender Zellen (PCNA) in MN9D-Zellen.
11. Reduktion des LRRK2 führt zu keinen Änderungen der Nestin-Expression in MN9D-Zellen.
12. Reduktion des LRRK2 führt zu keinen Änderungen der β_3 -Tubulin-Expression in MN9D-Zellen.
13. Reduktion des LRRK2 verursacht keine Änderungen in der mRNA-Expression von Zyklin D₁ in MN9D-Zellen.
14. Reduktion des LRRK2 verursacht keine Änderungen in der mRNA-Expression von CDKN1A in MN9D-Zellen.
15. Reduktion des LRRK2 verursacht keine Änderungen in der mRNA-Expression von RPA3 in MN9D-Zellen.
16. Reduktion des LRRK2 verursacht keine Änderungen im Reduktionspotential der MN9D-Zellen im MTT-Test.

17. Reduktion des LRRK2 verursacht keine Änderungen in der Inkorporation von BrdU in die DNA von MN9D-Zellen.
18. Reduktion des LRRK2 verursacht eine Wechselwirkung zwischen CDKN1A und PCNA, die zeitabhängig ist.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Schema der LRRK2-Domänenstruktur und –verteilung mit Domänengrenzen	7
Abbildung 1.2	LRR-Domäne mit krankmachenden Mutationen.	8
Abbildung 1.3	Modell des mutmaßlichen LRRK2-Pathomechanismus nach Singleton et al.	11
Abbildung 3.1	Flussdiagramm der Experimente.....	22
Abbildung 3.2	Versuchsaufbau	25
Abbildung 4.1	MN9D-Zellen im Kulturmedium, unbehandelt und nach Forskolin.....	37
Abbildung 4.2	MN9D-Zellen nach der Transfektion in der Fluoreszenzmikroskopie	38
Abbildung 4.3	Relative Genexpression nach LRRK2-Knockdown	39
Abbildung 4.4	Western Blots transfizierter („ko“) und nicht transfizierter („control“) MN9D-Zellen ...	41
Abbildung 4.5	Mittelwerte der Absorption im MTT-Test	43
Abbildung 4.6	Mittelwert der Absorption im BrdU-Test	44
Abbildung 4.7	Relative Expression von neuronalen Markergenen nach LRRK2-Knockdown	45
Abbildung 4.8	Relative Expression von Genen des Zellzyklus nach LRRK2-Knockdown	48
Abbildung 4.9	Die Genexpression in Abhängigkeit vom LRRK2-Knockdown	49
Abbildung 4.10	Graphische Darstellung der Beziehung von PCNA und CDKN1A	50

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Instrumente	16
Tabelle 2.2	Verbrauchsmaterial	17
Tabelle 2.3	Kits	17
Tabelle 2.4	Fertiglösungen	18
Tabelle 2.5	Chemikalien	18
Tabelle 2.6	Stocklösungen	19
Tabelle 2.7	Mediumkomponenten	19
Tabelle 2.8	Primer	20
Tabelle 2.9	Antikörper	21
Tabelle 2.10	Enzyme	21
Tabelle 2.11	Molekulargewichtsmarker	21
Tabelle 3.1	Zusammensetzung des Reaktionsmix für die RT-PCR	29
Tabelle 3.2	Zykluseinstellungen für die RT-PCR	30
Tabelle 3.3	Zusammensetzung Trenngel, 6 %	34
Tabelle 3.4	Zusammensetzung Sammelgel, 5 %	34

10 Lebenslauf

LARS FRANSECKY

MARTIN LUTHER PLATZ 11B, 01099 DRESDEN, GERMANY
PHONE +49(176) 66605714 • E-MAIL L.FRANSECKY@GMX.DE

PERSÖNLICH

Geboren am 30 / 07 / 1982 in Dresden

AUSBILDUNG

1994 - 2001 Romain Rolland Gymnasium, Dresden
Abitur

2002 - 2009 Medizinische Fakultät der Technischen Universität
Dresden und der Universität von Kantabrien, Spanien
Studium der Humanmedizin
Staatsexamen im Juni 2009

WISSENSCHAFTLICHE ERFAHRUNGEN

2007 - 2009 Center for Regenerative Therapies Dresden, Germany
Medizinische Doktorarbeit bei Alexander Storch
Dissertation mit dem Ziel die "Auswirkungen des LRRK2-Knockdown auf
die murine, dopaminerge Zellkultur MN9D" zu beschreiben
Voraussichtliche Verteidigung in 2009

2004-2005 Forschungsbereich Experimentelle Photobiologie
Arbeit als studentische Hilfskraft bei Peter Knuschke

ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN

Sprachen (Englisch > Spanisch > Italienisch > Latein)

Vorstand des 1. Futsal Club Dresden

11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Alexander Storch dafür, dass er mir eine wissenschaftliche Tätigkeit an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Technischen Universität Dresden ermöglichte und durch persönlichen Einsatz das zügige Beenden dieser Arbeit erst ermöglichte.

Mein Dank gilt zudem den Mitarbeitern des neurologischen Labors, die mir die Einarbeitung in die Laborarbeit einfach gestalteten und jederzeit für konstruktive Kritik zur Verfügung standen. Insbesondere geht mein Dank an Anne K. Meyer und Dr. Andreas Hermann, durch deren Supervision mein fachliches und praktisches Verständnis der Thematik kontinuierlich verbessert wurde. Ein besonderer Dank auch an Sylvia Kanzler, deren Arbeit den Rahmen für das erfolgreiche Arbeiten und Miteinander im Labor schaffte.

Für zahlreiche wissenschaftstheoretische Anregungen möchte ich ausdrücklich auch Dr. Roman Rodionov danken, der mich in meiner Überzeugung bestärkte, Wissenschaft und Medizin auch zukünftig miteinander verbinden zu können.

Meine geliebte Freundin Cecilia Bozzetti hat sich allzeit mit mir durch die Widrigkeiten bei der Erstellung einer Dissertationsschrift gekämpft. Ihrer Anwesenheit habe ich viel zu verdanken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, deren zuversichtliche Unterstützung bei dem Weg in den Berufsstart buchstäblich optimal gewesen ist. Ihr Vertrauen in der Zukunft zu rechtfertigen ist eine große Herausforderung.

12 Erklärung zur Selbstständigkeit

Situation: Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahren zum doctor medicinae (Dr. med.) für Lars Fransecky

Selbstständigkeit

„Ich habe die Dissertation zu den „Auswirkungen des LRRK2-Knockdown durch RNA-Interferenz auf die murine dopaminerge Zelllinie MN9D“ selbstständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt.“

Wissenschaftliche Betreuung

„Ich habe die Dissertation zu den „Auswirkungen des LRRK2-Knockdown durch RNA-Interferenz auf die murine dopaminerge Zelllinie MN9D“ unter der wissenschaftlichen Anleitung von Alexander Storch im Neurologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Neurologie durchgeführt.“

Einzigartigkeit

„Die Dissertation zu den „Auswirkungen des LRRK2-Knockdown durch RNA-Interferenz auf die murine dopaminerge Zelllinie MN9D“ wurde zu keinem Zeitpunkt und an keiner anderen Stelle zum Zwecke eines Promotions- oder anderen Prüfungsverfahrens eingereicht.“

Bisherige Promotionsversuche

„Es fanden bis zum heutigen Tag keine erfolglosen Promotionsversuche statt.“

Dresden, der 16. Juli 2009

Lars Fransecky
Martin Luther Platz 11 B
01099 Dresden

13 Referenzen

1. Stenzel, W., *Morbus Parkinson und verwandte Syndrome*. 2007, Sommersemester.
2. Gille, G., *Ätiogenese des Morbus Parkinson*, in *Klinik und Poliklinik für Neurologie*. 2007, TU Dresden: Dresden.
3. Di Fonzo, A., et al., *A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease*. *Lancet*, 2005. **365**(9457): p. 412-5.
4. Kachergus, J., et al., *Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations*. *Am J Hum Genet*, 2005. **76**(4): p. 672-80.
5. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
6. Bonifati, V., *Parkinson's disease: the LRRK2-G2019S mutation: opening a novel era in Parkinson's disease genetics*. *Eur J Hum Genet*, 2006. **14**(10): p. 1061-2.
7. Cookson, M.R., *Molecules that cause or prevent Parkinson's disease*. *PLoS Biol*, 2004. **2**(11): p. e401.
8. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. *Neuron*, 2004. **44**(4): p. 601-7.
9. Paisan-Ruiz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. *Neuron*, 2004. **44**(4): p. 595-600.
10. Funayama, M., et al., *An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family*. *Ann Neurol*, 2005. **57**(6): p. 918-21.
11. Mata, I.F., et al., *Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease*. *Neurogenetics*, 2005. **6**(4): p. 171-7.
12. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(46): p. 16842-7.
13. Andrade, M.A., C. Perez-Iratxeta, and C.P. Ponting, *Protein repeats: structures, functions, and evolution*. *J Struct Biol*, 2001. **134**(2-3): p. 117-31.
14. Mata, I.F., et al., *LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights*. *Trends Neurosci*, 2006. **29**(5): p. 286-93.
15. Bosgraaf, L. and P.J. Van Haastert, *Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1643**(1-3): p. 5-10.
16. Shen, J., *Protein kinases linked to the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Neuron*, 2004. **44**(4): p. 575-7.
17. Albrecht, M., *Correspondence Letter*, in *The Lancet*. 2005: MPI-SB, Saarbrücken.
18. Dachsel, J.C., et al., *Identification of potential protein interactors of Lrrk2*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2007. **13**(7): p. 382-5.
19. Melrose, H., et al., *Anatomical localization of leucine-rich repeat kinase 2 in mouse brain*. *Neuroscience*, 2006. **139**(3): p. 791-4.
20. Farrer, M., et al., *LRRK2 mutations in Parkinson disease*. *Neurology*, 2005. **65**(5): p. 738-40.
21. Singleton, A.B., *Altered alpha-synuclein homeostasis causing Parkinson's disease: the potential roles of dardarin*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(8): p. 416-21.
22. Cookson, M.R., G. Xiromerisiou, and A. Singleton, *How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease*. *Curr Opin Neurol*, 2005. **18**(6): p. 706-11.

23. Arkitek, *Flash Programm*, D.O.B.A.M.P. PHILLIP ZAMORE, UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL SCHOOL, D.O.I.M. APPOLINAIRE DJIKENG, YALE MEDICAL SCHOOL, and D.O.P.G. NAJIB M. EL-SAYED, INSTITUTE OF GENOMIC RESEARCH, Editors.
24. Bär, J., *Klonierung von short hairpin-Vektoren zum Knockdown von LRRK2 in muriner Zellkultur*, in *Klinik und Poliklinik für Neurologie*. 2007, TU Dresden: Dresden.
25. Carrington, J.C. and V. Ambros, *Role of microRNAs in plant and animal development*. Science, 2003. **301**(5631): p. 336-8.
26. Paddison, P.J., A.A. Caudy, and G.J. Hannon, *Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1443-8.
27. Paddison, P.J. and G.J. Hannon, *RNA interference: the new somatic cell genetics?* Cancer Cell, 2002. **2**(1): p. 17-23.
28. Choi, H.K., et al., *Immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion*. Brain Res, 1991. **552**(1): p. 67-76.
29. Rick, C.E., et al., *Differentiated dopaminergic MN9D cells only partially recapitulate the electrophysiological properties of midbrain dopaminergic neurons*. Dev Neurosci, 2006. **28**(6): p. 528-37.
30. Kuhne, B.S. and P. Oschmann, *Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis*. Biotechniques, 2002. **33**(5): p. 1078, 1080-2, 1084 passim.
31. Liebau, S., *Genexpressionsprofilanalysen von humanen adulten neuronalen Stammzellen*. 2003.
32. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
33. Biskup, S., et al., *Dynamic and redundant regulation of LRRK2 and LRRK1 expression*. BMC Neurosci, 2007. **8**(1): p. 102.
34. *The Cell*. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis et al., 5th Edition
35. Frouin, I., et al., *Human proliferating cell nuclear antigen, poly(ADP-ribose) polymerase-I, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 39265-8.
36. Leonardi, E., et al., *PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables*. J Clin Pathol, 1992. **45**(5): p. 416-9.
37. Zou, Y., et al., *Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses*. J Cell Physiol, 2006. **208**(2): p. 267-73.
38. Weng, Z., et al., *Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34479-91.
39. Aluigi, M., et al., *Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 454-61.
40. Hoglinger, G.U., et al., *The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3585-90.

41. Reynolds, A.J., et al. Retrograde axonal transport of dopamine beta hydroxylase antibodies by neurons in the trigeminal ganglion. *Neurochem Res.* 2005 Jun-Jul;30(6-7):703-12.